

PREPARACION DE UN CONJUGADO DE *Mycoplasma hyopneumoniae* PARA EL DIAGNOSTICO POR INMUNOFUORESCENCIA DIRECTA. DE LA NEUMONIA ENZOOTICA

Esquivel, MaE, Mendoza ES, Cruz, ST, Oliva, D., Mendoza, D-S, Hernández, R, Cibrián, A, Núñez M, Garrido I., Rincón A, Najar A, García, A, Juvenal, S, Hernández- Baumgarten E, Trujillo D, López, Ma.R y Ciprián CA.
FES-Cuautitlán, Posgrado. UNAM. seme@servidor.unam.mx

Introducción

Mycoplasma hyopneumoniae es un organismos infeccioso, del tracto respiratorio porcino, *M. hyopneumoniae* es el agente causal de la neumonía enzoótica porcina, y se caracteriza por ser una neumonía crónica con complicaciones por infecciones oportunistas con otras bacterias, como es el caso de *Pasteurella multocida* (1). El examen ha establecido que *M. hyopneumoniae* induce lesiones neumónicas que se presentan en un 80% en las necropsias en Estados Unidos. Durante la infección *M. hyopneumoniae* es asociado íntimamente en las células del epitelio ciliado de las vías respiratorias, resultando en agrupamiento y una pérdida excesiva de cilios con un decremento subsecuente de la función del aparato mucociliar (3). Las pruebas de inmunofluorescencia a pesar de que fueron las primeras en ser desarrolladas y se caracterizaron por el uso de compuestos fluorescentes o fluorocromos conjugados al anticuerpo, hoy en día se siguen utilizando. El objetivo del presente trabajo es la preparación de un conjugado de *M. hyopneumoniae* para el diagnóstico de la Neumonía Enzoótica por inmunofluorescencia directa (2,).

Materiales y Métodos

Se empleó un cerdo híbrido destetado de 6 a 12 semanas de edad, serológicamente negativo a *Mycoplasma hyopneumoniae*. Al cerdo se le administró 3.0 ml una bacterina de *M. hyopneumoniae*, cada semana durante un mes y medio, el inoculo se administró por vía subcutánea. A la vez, se le tomo una muestra de sangre, para conocer el comportamiento de anticuerpos presentes en el suero por medio de ELISA. Al sacrificio se hizo la recolección en blanco de sangre para obtener el suero, y así determinar los anticuerpos presentes, la concentración del mismo. Al suero obtenido durante el sacrificio del cerdo se le realizó la técnica de electroforesis para saber que tipo de inmunoglobulinas estaban presentes en el suero. Se realizó el procedimiento de suero, para después conjugarlo con Isotiocianato de fluoresceína y obtener un conjugado de *M. hyopneumoniae*. Los títulos de anticuerpos del conjugado se determinaron mediante la tinción de tejidos de pulmón positivos a *M. hyopneumoniae*. A partir de pulmones negativos y positivos al aislamiento de *M. hyopneumoniae* se realizaron las pruebas de evaluación del conjugado. El tejido pulmonar sano o afectado fue embebido en polietilenglicol (Tissue Tek) y congelados a -70°C. Las secciones fueron cortadas con un micrótopo (criostato) y fijadas en acetona a -20°C por 10 minutos. La tinción fue

realizada con una serie de diluciones que se iniciaron de 1:15 hasta 1:100 de conjugado fluorescente contra *Mycoplasma hyopneumoniae*.

Resultados y Discusión.

La serie de sueros que se obtuvieron desde la primera semana hasta la última mostraron valores expresados en % a la prueba de ELISA fueron: 1º: de 0.0; 2º: de 21.65; 3º: de 78.89 y 4º: de 478.

La concentración que se obtuvo de los anticuerpos presentes en el suero fue de 0.56 mg/ml y se determinó por medio de electroforesis que eran proteínas del tipo IgG. Se obtuvo el conjugado de Isotiocianato de Fluoresceína vs *M. hyopneumoniae*, se realizó la tinción de cortes histológicos de pulmones de cerdos infectados con *M. hyopneumoniae* y se observaron a través de un microscopio de fluorescencia, obteniéndose un título de 1/80. Se observó una reacción negativa de Inmunofluorescencia sobre un corte histológico de un pulmón de cerdo utilizado como control negativo para *M. hyopneumoniae*. Así mismo, se observó al microscopio de fluorescencia una reacción positiva de un corte histológico de un bronquiolo de pulmón de cerdo infectado con *M. hyopneumoniae*, observándose una fluorescencia principalmente en el epitelio bronquial

Bibliografía.

1. Ciprián, A., Pijoan, C., Cruz, T., Camacho, J., Tortora, J., Colmenares, G., Lopez-Revilla, R. and Garza de la, M. (1988). *Mycoplasma hyopneumoniae* increases the susceptibility of pigs to experimental *Pasteurella multocida* pneumonia. Can. J. Vet. Res., 52: 434-438.
2. Jensen E. and Pedersen Michael W. *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs: Duration of de diseaser and evaluation of four diagnostic assays. Veterinary Microbiology. 1997; 54: 23-34. pp. 1300-1310.
3. Young Theresa F; Thacker Eileen L; Erickson Barbara Z. and Ross Richard F. A tissue system to study respiratory ciliary epithelial adherence of selected swine mycoplasmas. Veterinary Microbiology. 2000; 71: 269-279.

Agradecimientos: Por su asistencia técnica al Sr. Gabino Sánchez, Ing. Draucin Jiménez, MVZ David Trujillo

Apoio: Cátedra "Afecciones Bacterianas y Virales del Cerdo" Proyecto PAPIIT IN223203-2