



DIAGNOSTICO DE LA NEUMONIA ENZOOTICA (*Mycoplasma hyopneumoniae*) POR EL METODO DE INMUNOPEROXIDASA DIRECTO.

Cruz S.T.A.*, Colmenares V.G., Mendoza E.S., Hernandez B.E., Ciprián C.
COORDINACION GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO, FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN, UNAM. APARTADO POSTAL 472. C.P. 54700, CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEXICO.
TEL. 913-8730834. AREA; SANIDAD ANIMAL. * BECARIO D.G.P.A. U.N.A.M.

RESUMEN

La neumonía Enzoótica es una enfermedad del cerdo que causa pérdidas económicas importantes a la porcicultura. Uno de los métodos de diagnóstico es la detección del agente causal, *Mycoplasma hyopneumoniae* en tejido pulmonar mediante la prueba de inmunofluorescencia. Sin embargo se ha descrito la prueba de inmunoperoxidasa como una alternativa a este método. En el presente trabajo se elaboró un conjugado de inmunoperoxidasa el cual por el método directo detectó *Mycoplasma hyopneumoniae* tanto en improntas del cultivo como en cortes de lesiones neumónicas de casos clínicos de Neumonía Enzoótica con aislamiento positivo al micoplasma. Se considera este conjugado un producto valioso dado que puede hacerse la lectura de la prueba mediante microscopio óptico.

INTRODUCCION

En la producción porcina mundial, los problemas neumónicos ocasionan importantes pérdidas económicas, siendo la Neumonía Enzoótica una afección de gran relevancia en este renglón. El diagnóstico de esta enfermedad se realiza con pruebas como ELISA y Fijación de Complemento. Para la detección del micoplasma en pulmón se usa la técnica de inmunofluorescencia, prueba que ha sido probada en México en su forma indirecta (Ciprián y cols.1982) y en su forma directa con la reciente elaboración de un conjugado fluorescente (Cruz y cols. 1993). sin embargo algunos autores proponen la prueba de inmunoperoxidasa como una alternativa, dada su facilidad de elaboración y de lectura, que incluso puede ser utilizada a partir de improntas de lesiones neumónicas (Bruggman y cols. 1977, Dayalu y Ross, 1990). Por ello el objetivo de este trabajo fue la elaboración de un conjugado de inmunoperoxidasa para su aplicación en el diagnóstico de la Neumonía Enzoótica mediante el método directo.

MATERIAL Y METODOS :

Se obtuvo un antisuero contra *Mycoplasma hyopneumoniae*, obtenido de un cerdo SPF, mediante un riguroso protocolo de inmunización con un inmunógeno específico. A partir del antisuero se obtuvo una fracción purificada de inmunoglobina G de acuerdo a la técnica descrita por Sanchez Vizcaíno (1990). El acoplamiento de la peroxidasa de rábano (Tipo IV sigma), se realizó por medio de peryodato de sodio de acuerdo al método descrito por Avrameas y Trnynck (1989). Para la titulación del conjugado se siguió la metodología modificada propuesta por Bruggman y cols. (1977), se emplearon frotis de *Mycoplasma hyopneumoniae* (cepa 194, donada por Ross, Universidad de Iowa), las cuales primeramente fueron fijadas en metanol absoluto con 0.1% de peróxido de hidrógeno por 20 minutos, con la finalidad de destruir la actividad de la peroxidasa endógena. Los frotis fueron lavados con agua destilada y después incubados con las diluciones del conjugado diluido con 0.5 M Tris-HCl, 0.15 M cloruro de sodio, 1mM de ácido Edético (EDTA) pH 7.5 (TBSE), por 60 minutos en cámara húmeda. Después los frotis fueron lavados por 15 minutos con tres cambios de TBSE. Posteriormente fueron incubados con el sustrato por 10 minutos. EL sustrato fue preparado de acuerdo a ternynck y Avrameas (1989) de la siguiente manera se disolvieron 5 mg. de tetracloruro de diaminobencidina (DAB, Sigma) en 10 ml. de una solución reguladora Tris Hcl 0.1 M, pH 7.6, añadiendo 0.1ml. de peróxido de hidrógeno al 3%. Se enjuagan los frotis con agua destilada, se secan y se montan en glicerol. Posteriormente se examinaron en un microscopio óptico. con la dilución establecida del conjugado fue utilizado en cortes de pulmones obtenidos por crióstato, de casos clínicos con lesiones características de Neumonía Enzoótica y aislamiento positivo del micoplasma. Como control negativo fueron usados cortes de un pulmón normal de un cerdo de 6 meses de edad así como de un pulmón fetal de cerdo. Todos estos cortes fueron tratados de la misma forma como los frotis del micoplasma.



DIAGNOSTICO DE LA NEUMONIA ENZOOTICA (*Mycoplasma hyopneumoniae*) POR EL METODO DE INMUNOPEROXIDASA DIRECTO.

Cruz S.T.A.*, Colmenares V.G., Mendoza E.S., Hernandez B.E., Ciprián C.
COORDINACION GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO, FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN, UNAM. APARTADO POSTAL 472. C.P. 54700, CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEXICO.
TEL. 913-8730834. AREA; SANIDAD ANIMAL. * BECARIO D.G.P.A. U.N.A.M.

RESULTADOS

Los organismos de *Mycoplasma hyopneumoniae* de los frotis fueron vistos como pequeñas estructuras café rojizas. Para el caso de los pulmones neumónicos estas estructuras fueron observadas al borde del epitelio bronquiolar. Para el caso de los controles negativos la observación de las estructuras mencionadas fue negativa.

DISCUSION

El desarrollo de esta prueba es relativamente rápida, el desarrollo de la técnica y su lectura es simple. La técnica puede ser útil en la localización de *Mycoplasma hyopneumoniae* en el pulmón, pudiendo ser una alternativa de la prueba de inmunofluorescencia a diferencia de esta el producto final de la reacción de la peroxidasa de la diaminobendicina es más estable y puede ser visible con el uso de un microscopio óptico. De ser estandarizado la técnica de inmunoperoxidasa en improntas del pulmón neumónico facilitaría el diagnóstico al evitar el uso de los costosos equipos del criostato y microscopio de luz ultravioleta empleados en inmunofluorescencia. Por lo tanto la técnica de inmunoperoxidasa viene a ser una alternativa diagnóstica en nuestro país donde se carece del diagnóstico de la Neumonía Enzoótica.

BIBLIOGRAFIA

- Bruggman B., Engberg B. and Ehrensperger F. (1977): Demostración de *Mycoplasma hyopneumoniae* in pig lungs on the enzyme-linked immunoperoxidase technique. *Vet. Rec.* 101.p137
- Ciprián, C.A, Cruz T. and Pijoian (1982) : Specific fluorescence against *Mycoplasma hyopneumoniae* in Pneumonic lungs of pig in México. *Proceedings of the International Pig Veterinary Congress.* México City. p.90.
- Cruz S.T, Colmenares V.G, Hernandez B.E, Ciprián C.A (1993): Diagnóstico de *Mycoplasma hyopneumoniae* por el método de inmunofluorescencia directa. *Memorias del XXVIII Congreso de AMVEC Can Cun Q, Roo.* Sept. p. 297-299
- Dayalu I.K and Ross R. (1990): *Vaccine Research Findings in Proceeding of Mycoplasma pneumoniae Symposia.* Smith kline Beechman. May August.
- Sánchez-Vizcaíno (1990): *Manual de laboratorio de inmunología.* Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias de Sanidad Animal. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Departamento de Sanidad Animal. Madrid, España
- Tenyinck T. and Avrameas (1989) *Técnicas enzimoinmunoquímicas en Técnicas Inmunoenzimáticas.* Editor Nicolás Grepe. Editorial Iberoamericana. Mexico. cap.4. p.53-63.