

PRUEBA DE INMUNOPEROXIDASA INDIRECTA PARA LA DETECCION DE *MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE* TEJIDO PULMONAR

LEÓN SÁNCHEZ C., CRUZ SÁNCHEZ, T.A. Y CIPRIÁN CARRASCO A.

Coordinación General de Estudios de Posgrado. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Universidad Nacional Autónoma de México. Av Primero de Mayo s/n. Colonia Atlanta. Cuautitlán I-calli, Edo. de México. C.P. 54700. Apartado Postal 222. Telefono y Fax 8730834. México.

Proyecto apoyado por PADEP:100302 UNAM

Cátedra: Microbiología de las Enfermedades Respiratorias del Cerdo.

INTRODUCCION.

El diagnóstico de la Neumonía Enzoótica se realiza de diversas maneras., una de ellas es la prueba de inmunofluorescencia para detectar el *Mycoplasma hyopneumoniae* en tejido pulmonar; sin embargo esta prueba tiene algunas limitantes, una de ellas es el empleo del microscopio de inmunofluorescencia y otra son los cortes a partir de muestras congeladas y teñidos no pueden conservarse por largos periodos. Por su parte, las técnicas inmunoenzimáticas que usan peroxidasa de rábano han sido desarrolladas para la detección de varios tipos de antígenos incluyendo a micoplasmas eliminando con ello complicaciones asociadas a los metodos fluorescentes. Una técnica de ensayo ligado a enzimas fue reportada por primera vez por Bruggman (1977) y posteriormente Doster y Chang (1988) repota el uso del método indirecto a partir de cortes de parafina con excelentes resultados tanto en sensibilidad como en especificidad. Por ello el objetivo del presente trabajo es reportar el uso de la prueba de inmunoperoxidasa indirecta para detectar *M. hyopneumoniae* en cortes de pulmón obtenidos en crióstato.

MATERIAL Y METODOS. Muestras pulmonares:

Se obtuvieron 12 pulmones de lechones de destete procedentes de una granja ubicada en el Municipio de Texcoco en el Estado de México, los cuales presentaban lesiones sospechosas de Neumonía Enzoótica .

Obtención de Anticuerpo primario:

Para la obtención del anticuerpo primario contra el micoplasma fueron inoculados 3 conejos Nueva Zelanda con la cepa 194 de *M. hyopneumoniae* donada por el Dr. Ross de la Universidad de Iowa (E.U.) y de acuerdo al protocolo de vacunación sugerido por Pijoan (1973). Los antisueros obtenidos fueron titulados mediante la prueba de ELISA Tween 20 (Hiix) modificada para suero de conejo .

Anticuerpo secundario:

Fue utilizado un anti-gG de conejo marcado con peroxidasa (Sigma Immunochemicals), el cual fue titulado previamente para su uso.

Preparación de las muestras:

Las muestras fueron colectadas de pulmones neumónicos colocandolas posteriormente en un crioprotector y congelandolas a -20 C. Como control negativo fue utilizada la muestra pulmonar de un cerdo de aproximadamente 3 meses de edad, que provenia de una granja libre de enfermedades respiratorias y que no presentaba lesiones macroscópicas. El control positivo fue obtenido de un cerdo que fue positivo a la prueba de inmunofluorescencia (BEEN-EK) y del que se aislo *Mycoplasma hyopneumoniae*. Todas las muestras fueron cortadas mediante el uso del microtomo criostato con una ancho de corte de 8 micras, posteriormente fueron fijadas con acetona a -20 C durante 10 minutos y congeladas a -20 C hasta el momento de su uso. Las muestras primeramente fueron sometidas a la prueba de inmunofluorescencia directa descrita por Cruz y cols (1993) con el empleo del conjugado de fluorescencia elaborado en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, U.N.A M

Técnica de Inmunoperoxidasa Indirecta:

Se colocaron los cortes en metanol absoluto con 0.1% de peroxido de hidrógeno por 20 minutos para destruir la peroxidasa endógena. Se lavan las laminillas con agua destilada y despues se coloco una gota del anticuerpo primario a la dilución óptima de 1: 1000 y se incubo a 37 C durante una hora en cámara húmeda. Se realizaron lavados con TBSE durante 15 minutos (tres cambios cada uno de 5 minutos). Se aplicó el conjugado anti IgG de conejo peroxidado a una dilución de 1: 1000, se incubo por una hora a 37 C en cámara húmeda. Se realizaron otros tres lavados con TBSE durante 15 minutos.

Se preparo el sustrato consistente en diamobenzidina (DAB Sigma ImmunoChemicals) de la siguiente manera: se adicionaron 5 mg de diamobenzidina (DAB) en 10 mls. de Tris HCl al 0.1 M pH 7.6 y se añidio 0.1 ml de peróxido de hidrógeno al 3% poco antes de verter el sustrato en las laminillas. Esta última solución se virtió en el sustrato y se dejo incubar de 7 a 10 minutos, transcurridos los cuales se enjuaguajo la laminilla. Se aplicó una gota de glicerol y un cubreobjetos y se observo al microscopio óptico.

RESULTADOS Y DISCUSION.:

En la prueba de inmunoperoxidasa indirecta de las muestras de campo trabajada resultaron positivas 10 y 2 negativas, coincidiendo los mismos resultados en la prueba de inmunofluorescencia. Los micoplasmas teñidos por la técnica de



inmunoperoxidasa indirecta fueron vistos como granulos caferojizos ubicados en torno al epitelio bronquiolar. Para el caso de la prueba de inmunofluorescencia directa se observaron la coloracion característica al rededor del bronquio. Esta técnica resulta sencilla y rapida de realizar. Para su interpretación al igual que en inmunofluorescencia es necesaria cierta experiencia. Es necesaria que en forma inmediata que los tejidos se fijen para su observación posterior, debido a que la humedad y el calor origina una decoloración de la muestra. A pesar de que los reactivos son caros, estos alcanzan para la realización de un gran número de pruebas, ya que a las diluciones en que se usan permiten un rendimiento mayor de ellos. Una de las observaciones que se apreció fue, que al agregar la solución revelaora o sustrato a los controles negativos y muestras negativas, estas permanecieron incoloras mientras que el control positivo y las muestras que resultaron positivas daban una coloración café que se apreciaba a simple vista, sin embargo es necesario la confirmación al microscopio. Segun algunos autores esta técnica es una buena alternativa dado que como lo demuestra Doster (1988) puede ser incluso mas sensible que inmunofluorescencia. En otro trabajo Sorensen y cols. (1994) demuestran que las técnicas de ELISA, Inmunofluorescencia y PCR son iguales, en cuanto a los resultados que de ellas se obtienen, para la detección del micoplasma en tejido pulmonar. Otra de las posibles aplicaciones, de la inmunoperoxidasa, es su uso en la identificación de colonias. En suma, se considera que ésta técnica es útil para el diagnóstico de la Neumonía Enzoótica en el país.

BIBLIOGRAFIA.

- Bruggman, B.E. and Ehrensperger F. Demostration of *A. suipneumoniae* in pig lungs in enzyme-linked immunoperoxidase technique. Vet. Rec. August 13, 1977.
- Cruz, S.T., Mendoza, E.S., Colmenares, V.G., Hernández, B.E., Ciprián C.A. Desarrollo de las técnicas de inmunofluorescencia e inmunoperoxidasa para la detección de *Mycoplasma hyopneumoniae* en tejido pulmonar. En Memorias del XIV Congreso panamericano de Ciencias Veterinarias. Acapulco, México. Octubre. p.145. 1994.
- Doster RA. and Chang Lin B. Identification of *Mycoplasma hyopneumoniae* ion formalin-fixed porcine lungs, using and indirect immunoperoxidase method. Am.J.Vet. res. Vol. 49, No. 10. October, p 1719-1721. 1988.
- Sorensen V., Barford K, Ahrens P., Friis N.F., Feenstra A.A., Pedersen M.W., Feld N.C. and Jensen N.E. Comparison- of four differents methods for demostration of *Mycoplasma hyopneumoniae* in lungs of experimental inoculated pigs. Proceedings of the 13th International Pig Veterinary Society Congress 26-30 June, Bangkok, Thailand. p.188. 1994.