



CORRELACION ENTRE LAS PRUEBAS DE INMUNOFLUORESCENCIA E INMUNOPEROXIDASA PARA LA DETECCION DE *MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE*.

Gutiérrez Becerril*, B.R, Cruz Sánchez T.A., Aguilera Cerón E., 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. Apartado Postal 222. Teléfono y Fax: 8730834. México.

Proyecto apoyado por PADEP: 100302. UNAM

Cátedra: Microbiología de las Enfermedades Respiratorias del Cerdo.

INTRODUCCION.

El aislamiento de *Mycoplasma hyopneumoniae* es difícil y complicado, de tal manera que se han puesto en práctica pruebas de diagnóstico para la detección del micoplasma en el pulmón. Tales pruebas son la de inmunofluorescencia, inmunoperoxidasa, reacción en cadena de la polimerasa, ELISA, sondas génicas. Sin embargo en los países Europeos y en los Estados Unidos la más utilizada actualmente es la prueba de inmunofluorescencia. En nuestro país estas técnicas no son muy conocidas y recientemente han sido implementadas las de inmunofluorescencia (IF) e inmunoperoxidasa (IP). (Cruz y cols 1994).

Ambas pruebas (IF e IP) tienen las cualidades de ser específicas y sensibles así como de su alta correlación con el aislamiento de *Mycoplasma hyopneumoniae*. Desde 1997, Bruggman reportó el uso de las técnicas inmunoenzimáticas para la detección del micoplasma en pulmones e improntas pulmonares y Doster y Chang (1988) emplean el método indirecto de inmunoperoxidasa haciendo una comparación con inmunofluorescencia.

Es por ello que el presente trabajo tiene como objetivo fundamental evaluar y comparar la efectividad de ambas pruebas, la de inmunofluorescencia e inmunoperoxidasa por el método directo.

MATERIAL Y METODOS

Muestras pulmonares.

Como control negativo se empleó un pulmón de cerdo de aproximadamente 3 meses de edad que no presentaba lesiones pulmonares y que procedía de una granja libre de enfermedades respiratorias. Como control positivo se empleó un pulmón de campo el cual en un estudio anterior había resultado positivo al aislamiento de *Mycoplasma hyopneumoniae* y a la prueba de inmunofluorescencia.

Se obtuvieron 6 muestras pulmonares provenientes de una granja del estado de México, con problemas respiratorios, perteneciente a lechones en etapa de destete, que presentaban lesiones sospechosas de Neumonía Enzootica, así como una del estado de Monterrey y dos de Puebla. Los pulmones provenientes del Estado de México fueron conservados en crioprotector (Tissue-Tek) a -20 C y los de Monterrey y Puebla fueron enviados a nuestro laboratorio en congelación.

A todos los pulmones se les aisló *Mycoplasma hyopneumoniae* y se identificaron por pruebas de inhibición del crecimiento y pruebas metabólicas específicas para cada caso.

Conjugados.

Para las pruebas fueron empleados los conjugados de *Mycoplasma hyopneumoniae* para inmunofluorescencia denominado BEEN-EK e inmunoperoxidasa denominado CHAK-EK que han sido elaborados en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Los conjugados fueron utilizados a una dilución óptima de trabajo de 1: 16 y 1: 8 respectivamente.

Preparación de las muestras.

Todas las muestras fueron cortadas mediante el uso del microtomo criostato (American Optical) de un espesor 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. Se realizaron preparaciones que contenían por lo menos dos cortes en cada laminilla procurando siempre incluir bronquio.

Técnicas de inmunofluorescencia e inmunoperoxidasa.

Se manejaron muestras pareadas para la utilización de los conjugados, para ambos conjugados se siguió la metodología utilizada por Cruz y cols (1993 y 1994), empleando en ambos casos el método directo.

Para la lectura de las muestras de inmunofluorescencia estas se realizaron en un microscopio de fluorescencia (Carl Zeiss) y las muestras de inmunoperoxidasa en uno óptico (Olimpus). En ambos casos las lecturas se realizaron por tres diferentes técnicos especializados, bajo el esquema de doble ciego.

RESULTADOS Y DISCUSION. Los resultados obtenidos de la lectura de las muestras pulmonares se encuentran en el Cuadro 1.

CUADRO 1. COMPARACION ENTRE FLUORESCENCIA E INMUNOPEROXIDASA EN LOS PULMONES ESTUDIADOS.

Prueba	Controles		Muestras de Campo							
	Positivo*	Negativo	1	2	3	4	5	6	7	8
Inmunofluorescencia	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+
Inmunoperoxidasa	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+
Aislamiento	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+

* Positivo al aislamiento de *M. hyopneumoniae* y a fluorescencia en estudio anterior.

Los datos fueron analizados por el método de Tukey, con un 95 % de confianza, encontrándose los grupos homogéneos.

Como puede apreciarse los controles tuvieron los resultados esperados. Sin embargo al realizar la prueba con las muestras de campo estas tuvieron un comportamiento como el reportado por Doster y Lin (1988), donde obtienen mayor número de positivos a la prueba de peroxidasa que a la de inmunofluorescencia. En otro trabajo parecido Sorensen y cols (1994) al comparar cuatro métodos de detección de antígeno de micoplasma en el pulmón como son aislamiento, inmunofluorescencia, PCR y una prueba de ELISA para detectar el micoplasma en lavado bronquial, encuentran que los resultados son iguales. Es por ello que no es de extrañarse en los resultados de este trabajo. Esta técnica ya se está empleando en otras enfermedades del cerdo en México tales como la Enfermedad de Aujeszky. Es por eso que se considera que la prueba de inmunoperoxidasa viene a ser una buena alternativa en el diagnóstico, ya que esta reduce costos, al realizar su lectura en un microscopio óptico.

BIBLIOGRAFIA.

- Bruggman, B.E. and Ehrensperger F. Demonstration of *M. suis* pneumoniae 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 R.A. and Chang Lin B. Identification of *Mycoplasma hyopneumoniae* on formalin fixed porcine lungs, using and indirect immunoperoxidase method. *Am. J. Vet. Res.* Vol. 49.No. 10. October, p. 1719-171. 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 different methods for demonstration of *Mycoplasma hyopneumoniae* in lungs of experimental inoculated pigs. Proceedings of the 13 th International Pig Veterinary Society Congress 26-30 June. Bangkok, Thailand. p. 188. 1994.