



Diagnóstico mediante inmunoperoxidasa (IPX) en tejidos

Rafael Baselga
exopol@exopol.com

Muchos de los patógenos responsables de las enfermedades en los conejos son bacterias que crecen fácilmente en medios de crecimiento bacteriano (*Pasteurella multocida*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, etc.). Al aislar estas bacterias las podemos identificar, hacer un antibiograma o una autovacuna.



Cepa de *Pasteurella multocida* en agar sangre incubado a 37° C durante 24 horas en aerobiosis. Obsérvese el aspecto mucoso de las colonias.

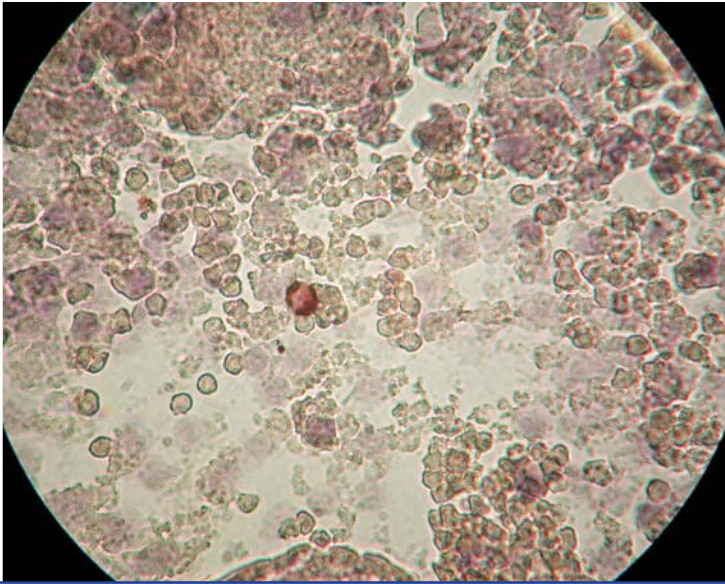
Sin embargo otros muchos patógenos, fundamentalmente los virus de la Mixomatosis y la Enfermedad Vírica Hemorrágica, o algunas bacterias como *Chlamidia psittaci*, *Leptospira interrogans*, *Mycoplasma pulmonis*, o parásitos como *Encephalitozoon cuniculi* son difíciles de aislar por cultivo y por eso se utilizan otras técnicas. En nuestro caso utilizamos la inmunocitoquímica utilizando como sustrato la peroxidasa (inmunoperoxidasa; IPX).



Gazapo que presentaba síntomas nerviosos, principalmente opistotonos (cabeza hacia atrás), movimientos incoordinados e hiperestesia. La clínica hacía sospechar de un proceso nervioso causado por el parásito *Encephalitozoon cuniculi*.



Riñón de coneja adulta en el que se observan pequeñas depresiones de la corteza y cápsula renales, que microscópicamente corresponden con áreas de nefritis intersticial. Son lesiones producidas por el parásito protozoo *Encephalitozoon cuniculi*, detectado en este órgano mediante inmunoperoxidasa indirecta.

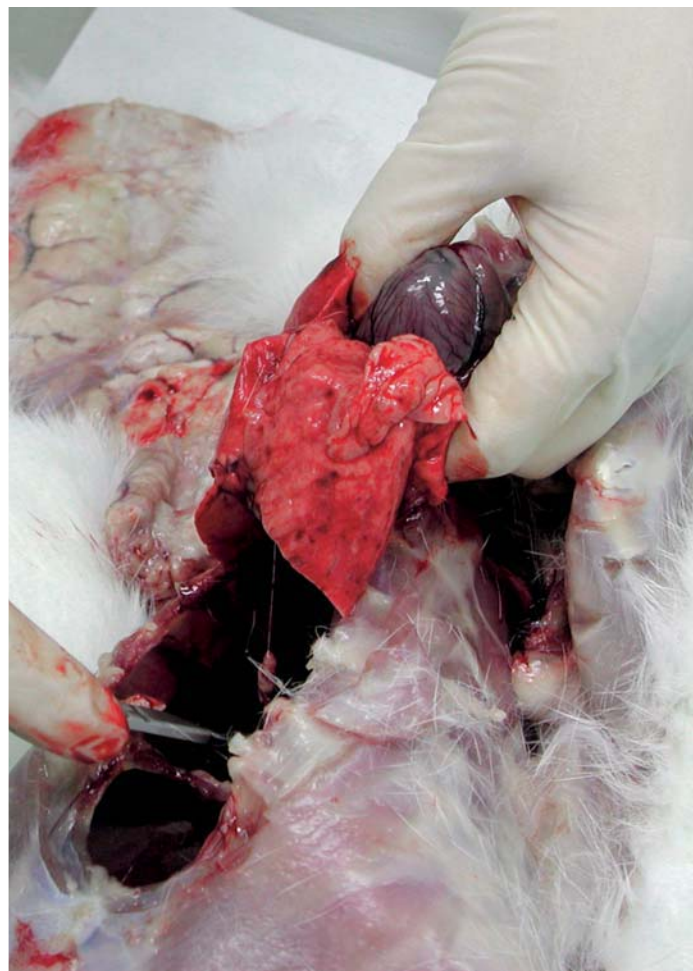


Encephalitozoon cuniculi detectado en células renales de conejo mediante inmunoperoxidasa indirecta. Se empleó un anticuerpo policlonal en conejo (Uppsala Suecia). Sustrato AEC en DMF. Contraste Hematoxilina de Mayer. Campo claro 1000 x. Animales de cebo con sintomatología nerviosa, parálisis de músculos mandibulares y barbilla mojada. Diagnóstico diferencial con Toxoplasma gondii, Listeria monocytogenes y Chlamydia psittacci. El parásito se observa teñido con claridad.

Al recibir los animales en el laboratorio se hace una necropsia, se observan las lesiones y síntomas del animal y se toman los órganos adecuados siguiendo las sospechas del veterinario. Con las muestras tomadas podemos hacer un diagnóstico microbiológico e inmunocitoquímico.



Chlamydia spp detectada en una célula epitelial procedentes de un muestra cervical. La detección del antígeno se realizó mediante inmunoperoxidasa indirecta, empleando un anticuerpo monoclonal género específico, MAb anti Chlamydia genus C5-C8 clones (Argene, Biosoft). Sustrato AEC en DMF. Contraste Hematoxilina de Mayer. Campo claro 1000 x. Clamidia aparece teñida en el centro de la célula infectada.



Extracción pulmones de conejo.

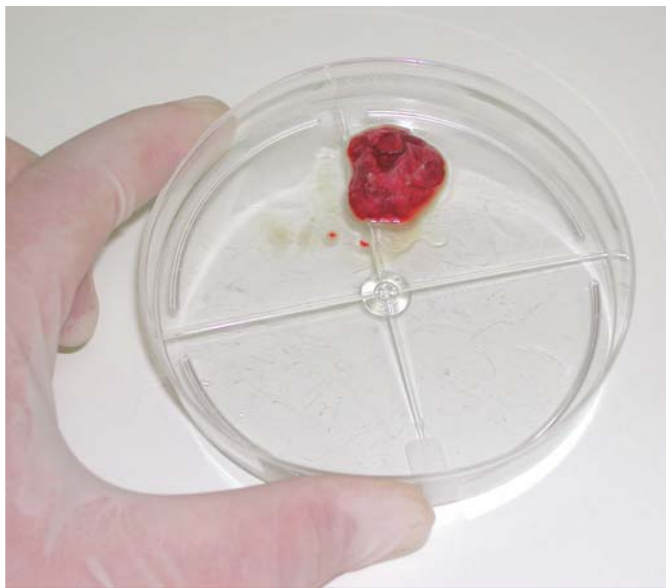


Necropsia del conejo, animal entero.



Órganos de conejo separados y listos para su procesamiento laboratorial.

-Los órganos necropsiados en los que se observan lesiones los utilizamos para sembrarlos individualmente en medios de crecimiento bacteriano (microbiología) y al mismo tiempo las muestras se procesan para realizar los estudios inmunocitoquímicos.



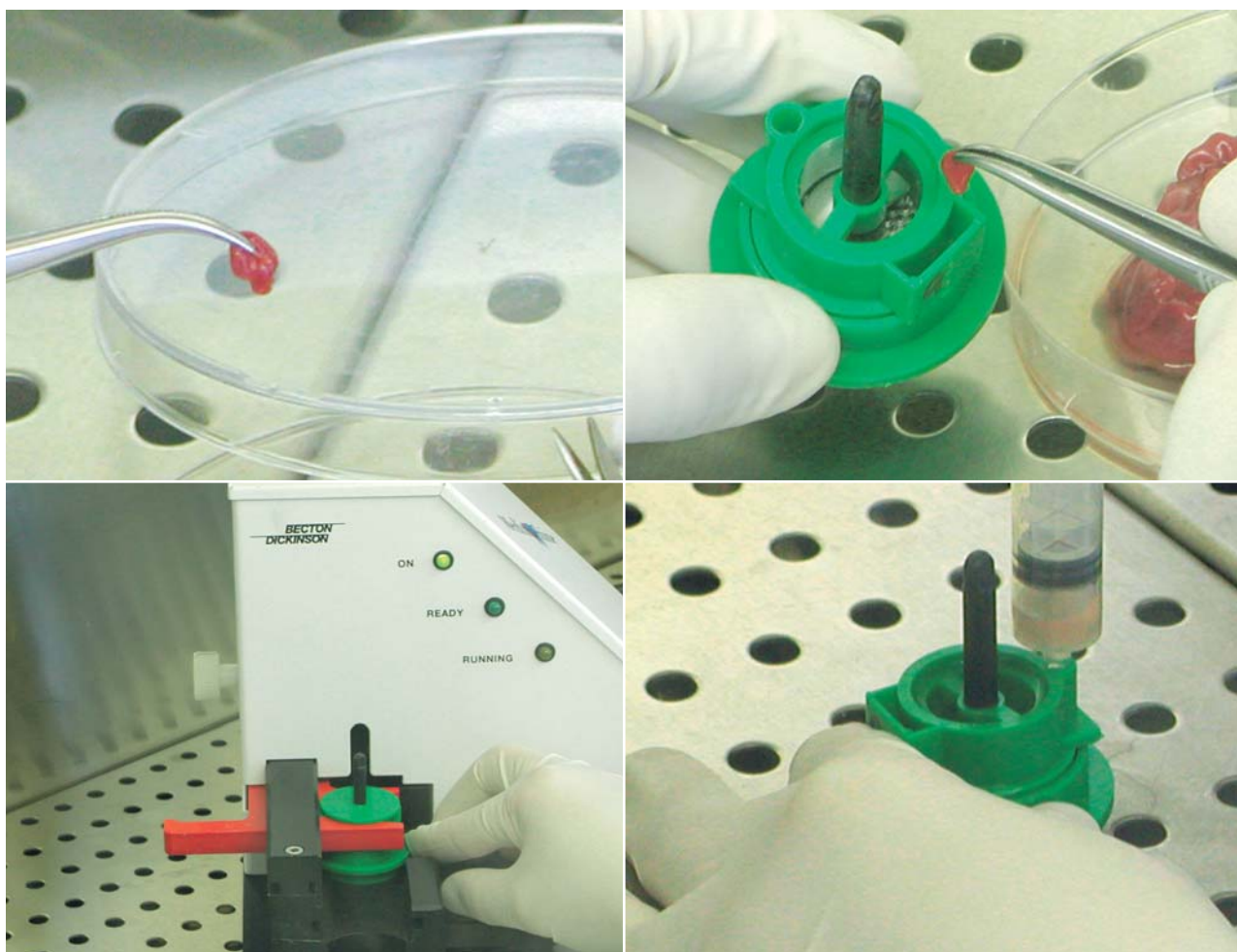
EXOPOL

autovacunas diagnóstico
animales producción

www.exopol.com

ISO 9001
▶▶▶ EC-1597/04

Los tejidos se disgregan para separar las células porque en la inmunocitoquímica (IPX) trabajamos con células individualizadas..



Extracción de células para IPX a partir de un pequeño trozo de tejido. Fotos de la secuencia del proceso.

La muestra procesada se traslada a un tubo Eppendorf donde se lava varias veces para eliminar cualquier detritus celular, restos metabólicos, etc. En todos los casos el tubo está numerado e identificado para evitar errores.

La muestra centrifugada que contiene las células que supuestamente están infectadas con virus, bacterias y/o mycoplasmas. Para comprobarlo se extienden en un porta donde se dejan secar y se fijan con alcohol.



En el fondo del tubo Eppendorf se ve un pellet formado por las células que se han obtenido al final del proceso. Sobre estas células hacemos el estudio inmunocitoquímico (IPX).



En cada uno de los pocillos del porta se deposita una alícuota de la suspensión celular. Todo se hace por duplicado (arriba y abajo) para tener controles de todos los estudios.

-Después de fijar las células al porta añadimos un anticuerpo primario específico frente a los patógenos que queremos estudiar: Mixomatosis, Vírica hemorrágica, Leptospiras, Clamidias, Mycoplasmas, etc.



20041130_93.jpg Los portas se lavan varias veces para eliminar los anticuerpos que no se hayan unido a los patógenos.

-En una segunda etapa añadimos el anticuerpo secundario para que se una al primer anticuerpo (solamente en el caso de que haya patógenos). Este anticuerpo lleva incorporada una enzima para positivar la unión. Luego, utilizamos una solución bloqueante para evitar las reacciones inespecíficas y añadimos un sustrato que reacciona con la enzima unida al anticuerpo secundario.



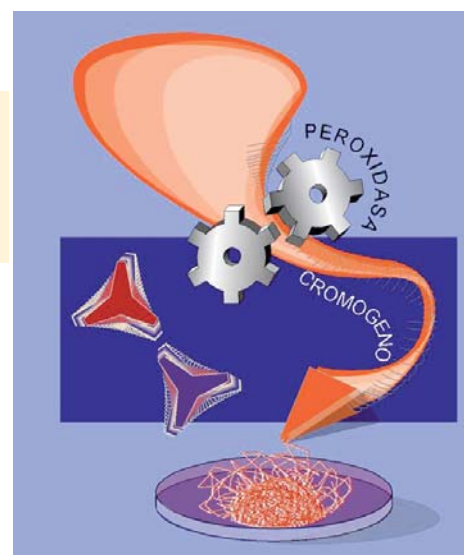
Lectura de IPX. Todas las muestras se leen en un microscopio por personal especializado. Todos los resultados se procesan y se envían inmediatamente al veterinario en 48 horas.

Además la técnica también la podemos emplear utilizando las células que se descaman con un hisopo. Estas muestras son fáciles de tomar y reducen sustancialmente el coste de la analítica porque el laboratorio no tiene que procesar y eliminar los animales remitidos.



Con una micropipeta se añade en cada pocillo un anticuerpo específico solamente frente a un patógeno. Si el patógeno está en el porta se unirá al mismo, sino será eliminado en los lavados siguientes.

-Incubamos la muestra a 37°C y con humedad para permitir que los anticuerpos se unan a los Mycoplasmas presentes en la muestra, luego lavamos los portas para eliminar los anticuerpos que no se hayan unido porque los patógenos no están presentes (muestras negativas).



Este dibujo esquematiza el proceso. Sobre un porta añadimos los anticuerpos primario y secundario y tras lavar para eliminar los que no han reaccionado en ausencia del patógeno se añade el sustrato.



Las células las podemos obtener a partir de hisopos que han raspado los órganos.