

Consideraciones técnicas sobre un método inmunohistoquímico para la detección del virus diarrea viral bovina en tejido fijado en formalina*

Lertora, J.W.; Sánchez Negrette, M.; Montenegro, M.A.; Frías, M.L.

Cátedra de Patología General y Sistemática, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Nordeste (UNNE), Sargento Cabral 2139, Corrientes (3400), Argentina. Tel/Fax 03783-425753. E-mail: patgral@vet.unne.edu.ar

Resumen

Lertora, J.W.; Sánchez Negrette, M.; Montenegro, M.A.; Frías, M.L.: *Consideraciones técnicas sobre un método inmunohistoquímico para la detección del virus diarrea viral bovina en tejido fijado en formalina.* Rev. vet. 18: 1, 58–61, 2007. El objetivo de esta comunicación es informar los aspectos técnicos más importantes de un método inmunohistoquímico para la detección del virus diarrea viral bovina en tejido fijado en formol y, de esta forma, proporcionar una guía que facilite la implementación de la técnica en otros laboratorios de histopatología. El protocolo que resultó en una tinción específica, intensa, que no alteró la morfología del tejido y presentó mínima tinción de fondo fue el que empleó proteinasa K al 0,2% durante 20 minutos a 37°C en cámara húmeda previa a la incubación con el anticuerpo 15C5 a la dilución 1:6000.

Palabras clave: bovino, virus diarrea viral bovina, método inmunohistoquímico.

Abstract

Lertora, J.W.; Sánchez Negrette, M.; Montenegro, M.A.; Frías, M.L.: *Technical considerations for the immunohistochemical detection of bovine viral diarrhoea virus in formalin fixed tissue.* Rev. vet. 18: 1, 58–61, 2007. The aim of this communication is to inform the most important technical aspects for immunohistochemical bovine viral diarrhoea virus detection in fixed formalin tissues, providing a guide that facilitates the implementation of the technique in other pathology laboratories. The proteinase K at 0.2% for 20 minutes at 37°C prior to the incubation with the 15C5 antibody in a 1:6000 dilution, was the protocol resultant in an specific and intense staining that didn't modified tissue's morphology.

Key words: cattle, bovine viral diarrhoea virus, immunohistochemical method.

INTRODUCCIÓN

El virus diarrea viral bovina (vDVB) es un importante patógeno del bovino, responsable de originar trastornos reproductivos, teratogénicos, infección persistente^{8, 17} e inmunodepresión^{10, 15}. Participa en el complejo de las enfermedades respiratorias del bovino^{3, 11} y en el complejo diarrea neonatal del bovino⁶, origina infección aguda severa de elevada morbilidad y mortalidad^{7, 21} y virus aislados del genotipo II causan el síndrome hemorrágico²³. Ninguna de estas presentaciones es patognomónica; por lo tanto, el diagnóstico se basa en el aislamiento del virus o en la detección de antígeno viral específico².

La técnica inmunohistoquímica (IHQ) ha demostrado ser eficaz, rápida, económica, sencilla y fácilmente implementable en cualquier laboratorio de histopatología^{13, 22}. Se realiza rutinariamente en tejidos fijados en formalina, superando a otras técnicas en términos de conveniencia respecto a la remi-

sión de las muestras, facilita el estudio retrospectivo de muestras enviadas para examen histopatológico de rutina y permite realizar una asociación precisa entre el antígeno viral con tipos celulares y lesiones histológicas⁹. Además, los anticuerpos calostrales no interfieren con la técnica, permitiendo analizar terneros neonatos⁴.

Recientemente, hemos realizado una encuesta serológica que demuestra que la infección con el vDVB es común en rebaños bovinos de la provincia de Corrientes¹⁶. Esto indujo al montaje y estandarización de un método inmunohistoquímico para la detección del vDVB en tejido fijado en formol al 10%, a fin de investigar la participación de este patógeno en los trastornos reproductivos de los bovinos de la región.

El objetivo de la presente comunicación es informar acerca de las consideraciones técnicas a tener en cuenta en el montaje y estandarización de este método.

MATERIAL Y MÉTODO

INTRODUCCIÓN

Como controles se emplearon biopsias de piel de bovinos persistentemente infectados y que no se encuentran en fase de infección aguda, para demostrar que la inmunidad adquirida por el virus de la diarrea viral bovina (VDV) es específica y que no se produce un efecto de inmunización cruzada con otros coronavirus. Para ello se realizaron cortes seriados de la epidermis de la piel de bovinos persistentemente infectados y se realizó una inmunotinción con el anticuerpo monoclonal 15C5 diluido a 1:6000. Como controles se emplearon biopsias de piel de bovinos persistentemente infectados y que no se encuentran en fase de infección aguda, para demostrar que la inmunidad adquirida por el virus de la diarrea viral bovina (VDV) es específica y que no se produce un efecto de inmunización cruzada con otros coronavirus. Para ello se realizaron cortes seriados de la epidermis de la piel de bovinos persistentemente infectados y se realizó una inmunotinción con el anticuerpo monoclonal 15C5 diluido a 1:6000.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El diagnóstico diferencial más importante es con el adenovirus bovino (BVD) y el coronavirus de la diarrea viral bovina (VDV). La inmunotinción con el anticuerpo monoclonal 15C5 diluido a 1:6000, previo tratamiento con proteinasa K al 0,2% durante 20 minutos a 37°C, resultó positiva en las células epiteliales de la epidermis de bovinos persistentemente infectados con VDV, pero negativa en las células epiteliales de bovinos persistentemente infectados con BVD. Estos resultados demuestran que la inmunidad adquirida por el virus de la diarrea viral bovina (VDV) es específica y que no se produce un efecto de inmunización cruzada con otros coronavirus.

Los resultados de la inmunotinción con el anticuerpo monoclonal 15C5 diluido a 1:6000, previo tratamiento con proteinasa K al 0,2% durante 20 minutos a 37°C, resultó positiva en las células epiteliales de la epidermis de bovinos persistentemente infectados con VDV, pero negativa en las células epiteliales de bovinos persistentemente infectados con BVD.

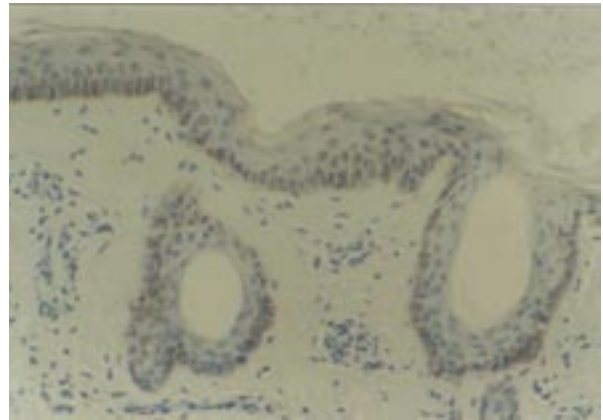


Figura 1. Piel de bovino persistentemente infectado. La incubación con el anticuerpo 15C5 dilución 1:6000 sin tratamiento enzimático previo, resulta en una inmunotinción negativa (20x).

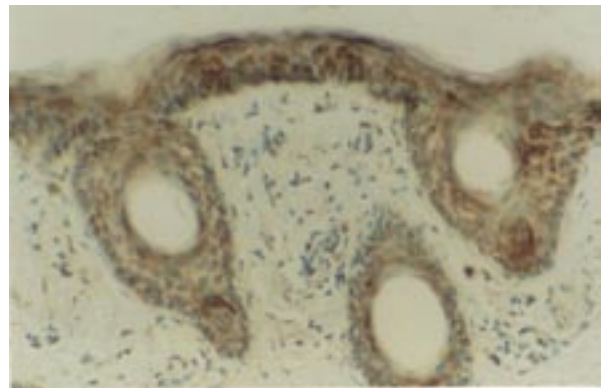


Figura 2. Piel de bovino persistentemente infectado. Intensa inmunomarcación del vDV con el anticuerpo monoclonal 15C5 dilución 1:6000, previo tratamiento con proteinasa K al 0,2% durante 20 minutos a 37°C (20x).

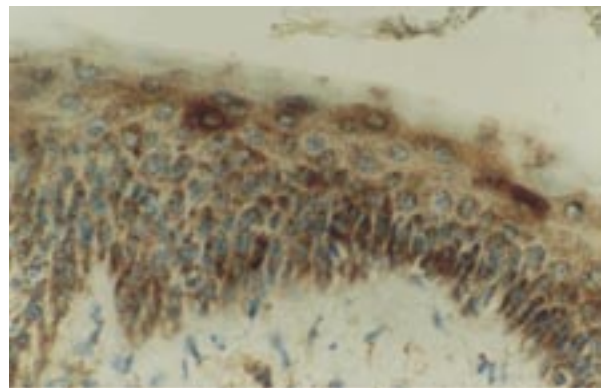


Figura 3. Epidermis de bovino persistentemente infectado. La inmunomarcación específica se visualizó como gránulos intracitoplasmáticos de diversos diámetros y de color marrón en las células epiteliales. Anticuerpo monoclonal 15C5 1:6000 (40x).

La más alta dilución del anticuerpo monoclonal 15C5 que resultó en una tinción específica e intensa fue la dilución 1:6000. Se consideró tinción específica a la visualizada como pigmento marrón claro en forma de gránulos de diversos diámetros ubicados en el citoplasma de las células epiteliales de la epidermis, células epiteliales de folículos pilosos, células epiteliales de glándulas, macrófagos y músculo liso (Figura 3). En las diluciones más concentradas se observó una reacción no deseada o inespecífica en algunas células epiteliales de la epidermis, folículos pilosos y macrófagos de los tejidos controles negativos. La tinción inespecífica se produjo durante la incubación con el anticuerpo primario en diluciones menores, ya que no se observó dicha reacción cuando se sustituyó el anticuerpo primario por PBS. La intensidad de dicha reacción fue disminuyendo a medida que se diluyó el anticuerpo primario hasta desaparecer con la dilución 1:6000 en los tejidos controles negativos. Dicha reacción no deseada se debió probablemente a uniones inespecíficas causadas por interacciones iónicas o hidrofóbicas entre el anticuerpo primario y las proteínas del tejido. Una posibilidad más remota, es la presencia de anticuerpos contaminantes presentes en el líquido ascítico del ratón donde se obtuvo el anticuerpo monoclonal¹². Otros investigadores que emplearon al anticuerpo 15C5 en diluciones de 1:600, 1:800 y 1:1000 no reportaron reacciones inespecíficas en los tejidos controles; aunque incluyeron el empleo de tratamientos para bloquear las uniones inespecíficas^{13, 14, 19}. En nuestro protocolo eliminamos la necesidad del tratamiento bloqueante al emplear la más alta dilución que resulte en tinción específica e intensa.

El vDVB presenta una amplia variabilidad genética y antigénica^{5, 18} y el empleo de un anticuerpo monoclonal puede resultar en falsos negativos. Sin embargo, el anticuerpo 15C5 es una inmunoglobulina G2b que reacciona con un epítopo de la glicoproteína viral E^{rns} o E0 (gp 48 Kd) altamente conservada entre los aislados del virus, capaz de detectar biotipos citopáticos y no citopáticos aislados del genotipo 1 y 2 del virus diarrea viral bovina, virus de la peste porcina clásica, virus de la enfermedad de la frontera del ovino y hay evidencias que demuestran que podría reaccionar con pestivirus caprinos^{1, 5, 13}. Por lo tanto, esperamos que el anticuerpo 15C5 sea capaz de detectar al vDVB de nuestra región. En el Anexo 1 se resume el protocolo empleado para la inmunomarcación del vDVB que, en las condiciones de nuestro laboratorio, resultó en una tinción específica e intensa.

En conclusión, el protocolo que resultó en una tinción específica intensa, que no alteró la morfología del tejido y presentó mínima tinción de fondo, fue el que empleó el tratamiento con proteinasa K al 0,2% durante 20 minutos a 37°C en cámara húmeda previa a la incubación con el anticuerpo 15C5 a la dilución 1:6000. Este método inmunohistoquímico, empleando el anticuerpo monoclonal 15C5, es una herramienta sencilla, económica y eficaz, que permitirá futuros estudios de diversos cuadros patológicos relacionados con el vDVB.

Agradecimiento. Los tejidos controles son cortesía del Dr. Germán Reinhardt del Instituto de Microbiolo-

gía de la Facultad de Ciencias de la Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.

Anexo 1

Protocolo de tinción inmunohistoquímica para antígeno del vDVB empleado en el Laboratorio de Inmunohistoquímica, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNNE

1. Desparafinar, rehidratar e inactivar la peroxidasa endógena por pasajes secuenciales en 1° xilol 10 minutos; 2° xilol 10 minutos; alcohol 100° 5 minutos; peróxido de hidrógeno al 3% en metanol durante 10 minutos; alcohol 96° 5 minutos, alcohol 80° 5 minutos; alcohol 70° 5 minutos y agua destilada 5 minutos. Lavar 3 veces en PBS durante 5 minutos.

2. Desenmascaramiento antigénico con proteinasa K al 0,2% en buffer TRIS-HCl 0,05 M, pH 7,5 durante 20 minutos a 37°C en cámara húmeda. Precalentar a 37°C la cámara y la enzima. Lavar 3 veces en PBS durante 5 minutos.

3. Aplicar el anticuerpo primario 15C5 (Dr. E. Dubovi, New York State College of Veterinary Medicine, Veterinary Diagnostic Laboratory, Cornell University, Ithaca, NY) en dilución 1:6000 e incubar durante toda la noche en refrigerador. Lavar 3 veces en PBS durante 5 minutos.

4. Aplicación del anticuerpo secundario marcado con biotina (anti-mouse biotinilado) e incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente en cámara húmeda. Lavar 3 veces en PBS durante 5 minutos.

5. Aplicación del complejo avidina-biotina-peroxidasa e incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente en cámara húmeda. Lavar 3 veces en PBS durante 5 minutos.

6. Aplicar el cromógeno 3,3-diaminobenzidina tetrahidrocloruro, 1 mg/ml en PBS suplementado con H₂O₂ (10 ul de H₂O₂ 50% en 5 ml PBS) e incubar en cámara húmeda oscura durante 10 minutos a temperatura ambiente. Lavar con abundante agua destilada.

7. Contraste con hematoxilina de Mayer durante 1 minuto; deshidratar con pasajes en alcohol 70°, alcohol 80°, alcohol 96°, alcohol 100°, alcohol 100°; aclarar en tres pasajes de xilol y montar con bálsamo de Canadá.

REFERENCIAS

1. **Baszler TV, Evermann JF, Kaylor PS, Byington TC, Dilbeck PM.** 1995. Diagnosis of naturally occurring bovine viral diarrhoea virus infections in ruminants using monoclonal antibody-based immunohistochemistry. *Vet Pathol* 32: 609-618.
2. **Bielefeldt Ohmann H.** 1995. The pathologies of bovine viral diarrhoea virus infection. *Vet Clin N Am Food Anim Pract* 11: 447-476.
3. **Brodersen BW, Kelling CL.** 1998. Effect of concurrent experimentally induced bovine respiratory syncytial virus and bovine viral diarrhoea virus infections on respiratory

tract and enteric diseases in calves. *Am J Vet Res* 59: 1423-1430.

DESCRIPCIÓN DEL CASO

4. Brodersen BW, White AK, Smith DR. 1998. Immunohistochemical diagnosis of thoracic mesothelioma in a dog. *J Vet Diagn Invest* 10: 103-107.

5. Brodersen BW, White AK, Smith DR. 1998. Immunohistochemical diagnosis of thoracic mesothelioma in a dog. *J Vet Diagn Invest* 10: 103-107.

6. Brodersen BW, White AK, Smith DR. 1998. Immunohistochemical diagnosis of thoracic mesothelioma in a dog. *J Vet Diagn Invest* 10: 103-107.

Los cortes procesados de acuerdo a la técnica de inmunohistoquímica fueron positivos a los anticuerpos anti citoqueratina (clon AE1, ratón, prediluido de Zymed), vimentina (clon V9, ratón, prediluido de Zymed), desmina (clon ZC18, ratón, prediluido de Zymed) y P-caderina (clon P-Cad, policlonal de conejo, dilución 1:50 de Zymed).

Los hallazgos morfológicos, tanto cito como anatomopatológicos y la reactividad inmunohistoquímica

de Kujthong AL. 1996. Obtención de mesotelioma peritoneal maligno difuso de tipo epitelial. *Rev. vet.* 17: 873-877.

16. Lertora WJ, Arzeno M, Crudeli GA. 2006. Detección de por el virus diarrea viral bovina en rebaños bovinos y bubalinos: informe preliminar. *Memorias de*

REFERENCIAS

1. Abutally AS, Siddiqui BJ, Roche WR. 2002. Diffuse malignant mesothelioma of the lung: a critical evaluation of its histological features. *Am J Surg* 184: 103-107.
2. Butcher K, Sporn EA, Hadjilovos SP, Roggi CL. 2000. Well-differentiated papillary mesothelioma. *Am J Surg Pathol* 24: 147-151.
3. Cantor RG, Jabir MA, Morla G, Lopez W. 2002. Diffuse malignant mesothelioma. *Am J Surg* 184: 103-107.
4. Schreyer RM, Fritzsche J, Wenzel R, Geyrhofer P, Geyrhofer P, Fritzsche J, Wenzel R. 2001. Experimental infection with the bovine coronavirus. *J Vet Diagn Invest* 13: 103-107.
5. Brodersen BW, White AK, Smith DR. 1998. Immunohistochemical diagnosis of thoracic mesothelioma in a dog. *J Vet Diagn Invest* 10: 103-107.
6. Brodersen BW, White AK, Smith DR. 1998. Immunohistochemical diagnosis of thoracic mesothelioma in a dog. *J Vet Diagn Invest* 10: 103-107.
7. Brodersen BW, White AK, Smith DR. 1998. Immunohistochemical diagnosis of thoracic mesothelioma in a dog. *J Vet Diagn Invest* 10: 103-107.
8. Brodersen BW, White AK, Smith DR. 1998. Immunohistochemical diagnosis of thoracic mesothelioma in a dog. *J Vet Diagn Invest* 10: 103-107.
9. Brodersen BW, White AK, Smith DR. 1998. Immunohistochemical diagnosis of thoracic mesothelioma in a dog. *J Vet Diagn Invest* 10: 103-107.
10. Brodersen BW, White AK, Smith DR. 1998. Immunohistochemical diagnosis of thoracic mesothelioma in a dog. *J Vet Diagn Invest* 10: 103-107.
11. Kim JH, Choi YK. 2002. Juvenile malignant mesothelioma in a dog. *J Vet Med Sci* 64: 269-271.
12. Leisewitz AL, Nesbit JW. 1992. Malignant mesothelioma in a seven-week-old puppy. *J S Afr Vet Assoc* 63: 70-73.
13. Nguyen GK, Akin MR, Villanueva RR, Slatnik J. 1999. Cytopathology of malignant mesothelioma of the pleura in fine-needle aspiration biopsy. *Diagn Cytopathol* 21: 253-259.
14. Reggeti F, Brisson B, Ruotsalo K, Southern E, Bienze D. 2005. Invasive epithelial mesothelioma in a dog. *Vet Pathol* 42: 77-81.
15. Wilson DW, Dungworth DL. 2002. Tumors of the respiratory tract. In: *Tumors in Domestic Animals* (Meuten DJ Ed), 4^o ed., Blackwell, Iowa, p. 365-399.