

ESTUDIO INMUNOHISTOLÓGICO DE LA NECROSIS PANCREÁTICA INFECCIOSA

An immunohistological study of infectious pancreatic necrosis

Gómez, S.*; Baudin, F.**; Castric, J.**

* Histología y Anatomía Patológica, Fac. Veterinaria, Univ. Murcia. 30071 Murcia, España.

** Laboratoire de Pathologie des Animaux Aquatiques. B.P. 70 — 29280. Plouzané, Francia.

Recibido: 5 Septiembre 1994

Aceptado: 7 Noviembre 1994

RESUMEN

Ha sido utilizada la técnica histoquímica avidina-biotina-peroxidasa, empleando un suero policlonal frente al virus de la necrosis pancreática infecciosa, para el diagnóstico de la enfermedad a partir de muestras incluidas en parafina de distintos órganos de truchas infectadas. La reacción positiva, observada en diversos órganos, es especialmente significativa en células pancreáticas exocrinas.

Palabras clave: Necrosis pancreática infecciosa. Inmunohistoquímica. Complejo avidina-biotina-peroxidasa. Trucha.

SUMMARY

An avidin-biotin-peroxidase complex immunohistochemical method using a polyclonal antiserum against the infectious pancreatic necrosis virus was applied to detect viral antigens in routinely paraffin embedded tissues of infected rainbow trout. A positive immunoreaction was present in several tissues, particularly in pancreatic exocrine cells.

Key words: Infectious pancreatic necrosis. Immunohistochemistry. Avidin-biotin-peroxidase complex. Rainbow trout.

INTRODUCCIÓN

La necrosis pancreática infecciosa (NPI) es una enfermedad de etiología vírica que incide

especialmente en salmónidos jóvenes sometidos a explotación intensiva, entre los que puede causar pérdidas elevadas (YASUTAKE, 1970). Las alteraciones más importantes se localizan

en el páncreas exocrino, aunque pueden ser observadas en otros tejidos (YASUTAKE, 1970; MUNRO *et al.* 1984; EVENSEN y RIMSTAD, 1990).

Entre las ventajas derivadas del empleo de las técnicas inmunohistoquímicas sobre cortes en parafina para el diagnóstico de enfermedades infecciosas animales, destaca el hecho de que permiten el conocimiento simultáneo de las lesiones y de la distribución del antígeno, así como la posibilidad de detectar agentes infecciosos que no pueden ser aislados (HAINES y CLARK, 1991).

Se describe el uso de la técnica avidina-biotina-peroxidasa (ABC) para la detección del antígeno viral en la necrosis pancreática infecciosa de la trucha sobre muestras de tejidos incluidos en parafina, utilizando un suero policlonal.

MATERIAL Y MÉTODOS

En el presente estudio se emplearon 30 alevines de trucha arco iris, infectados de forma espontánea, procedentes de explotaciones piscícolas, fijados completos en Bouin e incluidos en parafina. Para el estudio inmunocitoquímico se realizaron cortes de 5 μm de espesor, que fueron rehidratados y tratados con solución 1.5 % de peróxido de hidrógeno en metanol durante 20 minutos. Tras este paso, unas muestras recibieron tratamiento con tripsina al 0.1 % durante 30 min, otras con solución de urea 3 M y en el resto de los cortes estudiados no se practicó ninguna técnica destinada al desenmascaramiento antigénico. A partir de este paso, las secciones son incubadas de forma secuencial con suero normal de cerdo (Dako) diluido al 5 %, durante veinte minutos, suero policlonal de conejo anti-NPI, serotipo Sp (obtenido en el Laboratorio de Patología de los Animales Acuáticos de Plouzané, Francia), a diferentes concentraciones entre 1:1500 y 1:2000, y tiempos de incubación de 1 h a temperatura ambiente o 24 h a 4°C, suero biotinado de cerdo anti IgG de cone-

jo (Dako) a dilución 1: 200 y, finalmente, con el complejo ABC (Dako), incubando en ambos pasos durante veinte minutos. El protocolo básico de la técnica se corresponde con el descrito por HSU *et al.* 1981. Finalmente, las muestras fueron reveladas con diaminobencidina, contrastadas con hematoxilina y montadas. Asimismo, se realizaron controles positivos y negativos en cada uno de los grupos de muestras inmunomarcadas.

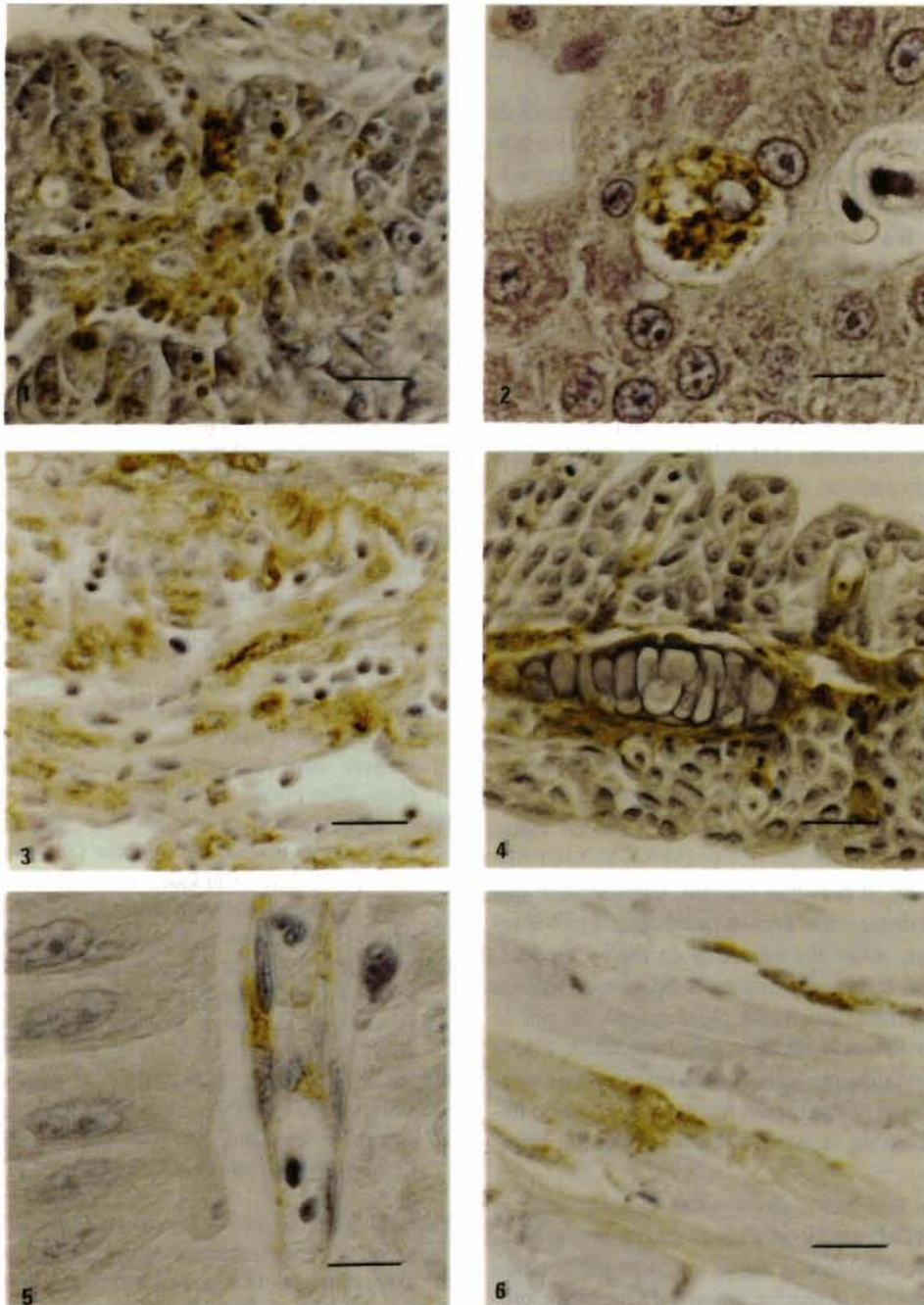
RESULTADOS

Los cortes tratados mediante la técnica ABC muestran reacción positiva en los órganos anteriormente citados, especialmente cuando se incuban durante una hora a temperatura ambiente y no han recibido tratamiento enzimático previo. El inmunomarcaje se manifiesta en forma de precipitados marrones en los tejidos que contienen el antígeno viral.

De los órganos estudiados, el más afectado resultó ser el páncreas, donde el antígeno aparece tanto en el interior de células acinosas degeneradas como extracelularmente, adyacente a las que han sido destruidas (Fig. 1). Asimismo, se aprecia inmunomarcaje en hígado, con presencia de precipitados marrones en el citoplasma de hepatocitos degenerados y aumentados de tamaño (Fig. 2), células musculares cardíacas (Fig. 3), endotelio de vasos branquiales (Fig. 4) y de lámina propia intestinal (Fig. 5), fibras musculares esqueléticas alteradas (Fig. 6) y células endoteliales de riñón anterior.

DISCUSIÓN

Diferentes técnicas inmunohistoquímicas han sido aplicadas al estudio de las enfermedades infecciosas de los peces con resultados satisfactorios (HOFFMAN *et al.* 1989; JANSSON *et al.* 1991). Son consideradas de gran interés para el diagnóstico de las mismas, permitiendo la identificación de los agentes etiológicos en muestras previamente fijadas y cuando otros méto-



Inmunomarcaje positivo en: Células del páncreas exocrino (Fig. 1, barra = 25 μm), hígado (Fig. 2, barra = 100 μm), células musculares cardíacas (Fig. 3, barra = 25 μm), endotelio branquial (Fig. 4, barra = 25 μm), de lámina propia intestinal (Fig. 5, barra = 100 μm), y células musculares esqueléticas (Fig. 6, barra = 25 μm).

dos no pueden ser aplicados o resultan ineficaces (EVENSEN y RIMSTAD, 1990; GÓMEZ *et al.* 1993).

Las observaciones realizadas en el curso de la necrosis pancreática infecciosa, tanto de presentación espontánea como inducida, ponen de manifiesto cambios degenerativos centrados en el páncreas exocrino asociados con fenómenos de infiltración celular moderados (MUNRO *et al.* 1984; EVENSEN y RIMSTAD, 1990) y hallazgos esporádicos de cuerpos de inclusión (YASUTAKE, 1970; QUAGLIO, 1989). A pesar de que algunos estudios sobre la enfermedad no reflejan la aparición de lesiones hepáticas en el curso de la misma (MUNRO *et al.* 1984), éstas han sido puestas de manifiesto en la trucha con el método inmunohistoquímico empleado. Por otra parte, los fenómenos degenerativos en fibras musculares esqueléticas que acompañan al proceso, considerados inespecíficos por otros autores cuando no se emplearon técnicas selectivas (YASUTAKE, 1970), parecen estar relacionados con la acción del virus, a juzgar por el inmunomarcaje que se observa en ellas.

El pretratamiento enzimático ha sido utilizado en la técnica ABC para el diagnóstico de esta enfermedad en salmones, con resultados variables según el serotipo (EVENSEN y RIMSTAD, 1990). En el presente estudio, cabe señalar que resulta demasiado agresivo, a juzgar por los resultados, sobre las muestras de trucha empleadas, aún a dosis inferiores a las recomendadas en los protocolos inmunohistoquímicos, por lo que no lo consideramos recomendable. Puede ser sustituido por otros métodos de desenmascaramiento antigénico o hacerse innecesario dependiendo de la composición del fijador elegido.

Los resultados de este estudio muestran la validez del método inmunohistoquímico utilizado para diagnóstico de la necrosis pancreática infecciosa de la trucha, a partir de muestras previamente fijadas e incluidas en parafina.

BIBLIOGRAFÍA

- EVENSEN, O., RIMSTAD, E. 1990. Immunohistochemical identification of infectious pancreatic necrosis virus in paraffin-embedded tissues of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *J. Vet. Diagn. Invest.* 2: 288-293.
- GÓMEZ, S., BERNABÉ, A., GÓMEZ, M.A., NAVARRO, J.A., SÁNCHEZ, J. 1993. Mycobacteriosis: morphopathological and immunohistochemical aspects. *J. Fish Dis.* 16: 137-141.
- JANSSON, E., HONGSLO, T., LINDBERG, R., LJUNDBERG, O., SVENSSON, B. 1991. Detection of *Renibacterium salmoninarum* and *Yersinia ruckeri* by the peroxidase-antiperoxidase immunohistochemical technique in melanin-containing cells of fish tissues. *J. Fish Dis.* 14: 689-692.
- HAINES, D., CLARK, E. 1991. Enzyme immunohistochemical staining of formalin-fixed tissues for diagnosis in veterinary pathology. *Can. Vet. J.* 32: 295-302.
- HOFFMANN, R., BELL, G., PFEIL-PUTZIEN, OGAWA. 1989. Detection of *Renibacterium salmoninarum* tissues sections by different methods — a comparative study with special regard to the indirect immunohistochemical peroxidase technique. *Fish Pathol.* 24: 101-104.
- HSU, S., RAINE, L., FANGER, H. 1981. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J. Histochem. Cytochem.* 29: 577-580.
- QUAGLIO, F. 1989. Le infezione da birnavirus con particolare riferimento alla necrosi pancreatica infettiva dei salmonidi. *Riv. Ital. Acquacol.* 24: 167-179.
- MUNRO, A., SMAIL, D., WADELL, I., ELSON, K. 1984. Studies of INP virus in farmed Atlantic salmon in Scotland. En: *Fish Diseases. Fourth Copraq Session*, pp. 34-42. Acuirgrup. ATP Madrid.
- YASUTAKE W.T. 1970. Comparative histopathology of epizootic salmonid virus diseases. En: *A Symposium on Diseases of Fishes and Shellfishes*, 340-350. SNIESZKO, S. F. (ed.). American Fisheries Society. Washington.