

# Análisis de técnicas de recuperación antigénica para la detección inmunohistoquímica del virus de la diarrea viral bovina

MARINI, M.R.<sup>1</sup>; CANAL, A.M.<sup>1</sup>; SALVETTI, N.R.<sup>2</sup>; ORTEGA, H.H.<sup>2,3</sup>

## RESUMEN

En el presente trabajo se evaluaron diferentes métodos de recuperación antigénica para permitir la inmunodetección del virus de la Diarrea Viral Bovina (vDVB) en materiales fijados con formol. Se analizó el efecto de la aplicación de digestión proteolítica (ficina, tripsina, pepsina, proteinasa K) y su combinación con tratamiento en un horno microondas empleando diferentes concentraciones y tiempos de incubación para el anticuerpo primario. El tratamiento más efectivo fue el realizado con proteinasa K, utilizando diluciones de 1:30 para los anticuerpos primarios, con incubación durante toda la noche a temperatura ambiente. Concluimos que la fijación formólica afecta la antigenicidad del vDVB pero estos efectos pueden ser revertidos por digestión proteolítica específica permitiendo la utilización de la inmunohistoquímica como técnica de rutina para el diagnóstico de la enfermedad.

*Palabras clave:* (DVB), (recuperación antigénica), (inmunohistoquímica)

<sup>1</sup> Cátedra de Patología Básica- Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional del Litoral.; <sup>2</sup> Departamento de Anatomía e Histología Embriología. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional del Litoral.; <sup>3</sup> Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas. Correspondencia: Dr. Hugo H. Ortega, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral. R.P. Kreder 2805 – Esperanza (3080) Santa Fe, ARGENTINA. Tel/Fax: 03496-420639; e-mail: hhortega@fcv.unl.edu.ar  
Recibido: agosto 2005 - Aceptado: junio 2006 - Versión on line: junio 2006

InVet. 2006, 8(1): 59-65  
ISSN(papel): 1514-6634  
ISSN (on line) 1668-3498

59

## Analysis of antigen retrieval techniques for the immunohistochemical detection of the Bovine Viral Diarrhea virus

### SUMMARY

In the present work different methods of antigen retrieval were evaluated to allow the immunodetection of the Bovine Viral Diarrhea virus (BVDv) in materials fixed with formol. The effect of the application of proteolytic digestion was analyzed (ficin, trypsin, pepsin, proteinase K) and its combination with treatment in a microwave oven using different concentrations and times of incubation for the primary antibody. The most effective treatment was the one carried out with proteinase K, using 1:30 dilution for the primary antibodies, with overnight incubation at room temperature. We conclude that the formol fixation affects the antigenicity of the BVDv but these effects can be reverted by specific proteolytic digestion allowing the use of the immunohistochemical routine technique for the diagnosis of the disease.

*Keywords:* (BVD), (antigen retrieval) (immunohistochemistry).

### INTRODUCCIÓN

El virus de la Diarrea Viral Bovina (vDVB) es un agente causante de grandes pérdidas en el ganado bovino debido a los abortos, muertes perinatales, nacimientos prematuros y al amplio rango de malformaciones que produce. Este virus está clasificado por su estrategia replicativa como miembro de la familia *Flaviviridae*, género *Pestivirus*, y se encuentra ampliamente difundido en la región de la Cuenca Lechera Santafesina, como lo señalan trabajos previos<sup>9</sup>.

Se han descrito 2 genotipos de cepas del virus, de acuerdo con su comportamiento patogénico y diferencias genómicas: el 1, clásico, que causa los cuadros de diarrea y enfermedad de las mucosas, y el 2, que actuaría causando los síndromes hemorrágicos y trombocitopatógenicos. Las cepas del vDVB se clasifican en no citopatogénicas (NCP) y citopatogénicas (CP), de acuerdo al efecto que causan en cultivos celulares susceptibles<sup>9</sup>.

Dado que no existen signos clínicos patognomónicos de la infección por DVB en bovinos, las investigaciones diagnósticas dependen fundamentalmente de pruebas de laboratorio. Estas técnicas se basan en la detección del virus, los antígenos virales o los anticuerpos inducidos por el virus en las muestras obtenidas y en consecuencia, el vDVB puede ser diagnosticado por aislamiento, ELISA, PCR, Western blot e Inmunohistoquímica (IHQ)<sup>11</sup>.

El desarrollo de nuevas técnicas inmunohistoquímicas ha logrado una alta sensibilidad sin una reducción importante en su especificidad. Por otra parte, la generación de anticuerpos mono y policlonales específicos ha permitido la localización de antígenos virales en preparaciones histológicas permanentes, preservando la morfología para una evaluación más integral.

La IHQ se ha transformado en los últimos años en una herramienta esencial en patología. Su principales ventajas son la facilidad de toma

y remisión de muestras, la posibilidad de realizar estudios retrospectivos de muestras enviadas previamente para diagnóstico histopatológico y la asociación precisa entre el antígeno viral con tipos celulares y lesiones<sup>7</sup>. Sin embargo su estandarización es laboriosa y la calidad de los resultados depende básicamente de la fijación y procesamiento de los tejidos, desenmascaramiento de epitopes, sensibilidad de los sistemas de detección y calidad de los anticuerpos<sup>13</sup>.

La aplicación de la IHQ como técnica de rutina en el diagnóstico de DVB se enfrenta a la dificultad principal de la calidad del material o procesamiento de las muestras. La mayoría de los trabajos publicados hasta el presente, donde se ha inmunodetectado el vDVB, se han basado en la obtención de las muestras y su procesamiento inmediato o en la utilización de cortes obtenidos por técnicas de congelación sin fijación formólica<sup>1,2,4,5,8,14</sup>. Sin embargo en las condiciones habituales de trabajo "a campo", los materiales no son fijados adecuadamente ni procesados inmediatamente, lo que lleva a la sub o sobrefijación con pérdida de determinantes antigénicos en mayor o menor medida.

A fin de hacer frente a las dificultades ocasionadas por la sobrefijación, se han desarrollado numerosos métodos de recuperación antigénica, basados en procedimientos físicos (microondas, ebullición, ultrasonido), químicos (digestión enzimática) o la combinación de ambos, con la finalidad de poner en evidencia los antígenos enmascarados por la fijación<sup>6, 12</sup>.

El objetivo del presente trabajo fue estandarizar la técnica de inmunodetección de vDVB en tejidos procesados según técnicas histológicas de rutina, a fin de facilitar su aplicación como método de diagnóstico. Para ello evaluamos varias combinaciones de métodos de recuperación antigénica,

concentraciones de anticuerpos y cromógenos a fin de lograr la mayor sensibilidad y especificidad, conservando de la mejor manera posible la morfología tisular.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se obtuvieron muestras de diferentes órganos de un ternero infectado persistentemente con aislamiento de vDVB tipo 1 a partir de sangre y pool de órganos. Las muestras fueron fijadas en formol al 10% 24 h y procesadas siguiendo protocolos histológicos de rutina<sup>15</sup>. Como control positivo se utilizaron muestras de piel de terneros persistentemente infectados facilitados por gentileza del Dr. Javier Lértora<sup>7</sup>. Como controles negativos se utilizaron materiales de diferentes órganos de otras especies.

Los cortes se desparafinaron en xilol y se hidrataron en soluciones decrecientes de alcohol etílico y finalmente en buffer fosfato salino (PBS). Se realizó la inactivación de la peroxidasa endógena con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% en metanol por 20 minutos (luego de la hidratación) y el bloqueo de las uniones inespecíficas con suero normal de cabra al 1% por 15 minutos (previo a la incubación con el anticuerpo primario).

La recuperación antigénica incluyó 4 tratamientos de digestión enzimática diferentes y sus combinaciones con tratamiento en microondas:

Digestión enzimática con las siguientes preparaciones comerciales  
ficina (Zymed® Digest-All Cat No. 00-3006)  
tripsina (Zymed® Digest-All Cat No. 00-3006)  
pepsina (Zymed® Digest-All Cat No. 00-3006)  
proteínasa K (Dako® Cat No. S3020)

La incubación con cada una de estas enzimas se realizó de acuerdo a las

recomendaciones de los fabricantes, luego de la inactivación de la peroxidasa.

El tratamiento con microondas se realizó en un equipo de uso doméstico (potencia máxima 1000 W). Como solución se usó buffer citrato 0,01 M pH 6,0, el cual se calentó 3 minutos a 100% de potencia, 12 minutos a 40% y 20 minutos dentro del microondas apagado<sup>10</sup>.

Como anticuerpos primarios se utilizaron los clones 157 (VMRD® Cat No. 157) dirigido específicamente a la proteína E2 (gp53) del vDVB tipo 1 y BA-29 (VMRD® Cat No. BA-29) dirigido a la proteína E2 (gp53) del vDVB tipo 2<sup>3</sup>. Ambos anticuerpos se probaron en diluciones entre 1:10 y 1:50 con tiempos de incubación que variaron entre 1 h y 18 h, a 4°C y temperatura ambiente.

Para el revelado de la reacción antígeno-anticuerpo se utilizó el sistema biotina-streptoavidina-peroxidasa. El anticuerpo secundario biotinilado (Zymed® Cat No. 81-6540, dilución 1:120) se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente al igual que el complejo streptoavidina-peroxidasa (Biogenex® Cat No. HK330-9K). Como cromógenos se utilizaron alternativamente aminoetilcarbazol (AEC) (Biogenex® Cat No. HK139-5K) o diaminobencidina (DAB) (Dako® Cat No. K3466). Entre cada uno de los pasos descritos se efectuaron 3 lavados con PBS. Finalmente las muestras fueron coloreadas con hematoxilina y montadas con Ultramount (Dako® Cat No. S1964).

## RESULTADOS

Cuando no se efectuó ningún tratamiento de recuperación antigénica, al igual que con el tratamiento con ficina o microondas solo, la inmunomarcación fue negativa en todos los preparados en las diferentes diluciones y tiempos de incubación empleados.

La digestión enzimática con tripsina y pepsina produjo una alta destrucción de los tejidos con reacción inespecífica tanto en los controles negativos como en el resto de las muestras.

El tratamiento más efectivo fue el realizado con proteinasa K, utilizando diluciones de 1:30 para los anticuerpos primarios, con incubación durante toda la noche a temperatura ambiente.

Se obtuvieron buenos resultados con ambos cromógenos. Sin embargo, el AEC (rojo) permitió una mejor diferenciación de la reacción frente a la presencia de pigmentos endógenos (melanina, bilirrubina, hemosiderina, etc).

Los linfocitos del bazo, los ganglios linfáticos y el timo tuvieron inmunomarcación en la mayoría de los animales positivos. También se observó inmunomarcación en hepatocitos y células endoteliales de los vasos sanguíneos, así como en células epiteliales de los bronquios y alvéolos pulmonares (Figura 1). En intestino se observó reacción tanto en los enterocitos como en el tejido linfático asociado, sobre todo a nivel de la válvula ileocecal. En riñón se observaron inmunomarcadas algunas células epiteliales de los túbulos. En la piel se observó inmunomarcación en las células epiteliales de los folículos pilosos y las glándulas sudoríparas, así como también en los endotelios de vasos sanguíneos y linfáticos. En dos de los casos positivos, en los cuales se remitió la placenta, se observó reacción positiva en las células epiteliales (Figura 2). También se observó inmunomarcación en las células epiteliales de los folículos tiroideos. Se observaron cardiomiocitos inmunomarcados, aunque no en todos los casos positivos analizados.

El tratamiento en horno de microondas no solo no mejoró la reacción, si no que en el caso de la combinación con proteinasa K, la reacción disminuyó y se vio afectada la morfología del tejido con desprendimiento de las muestras.



Figura 1. Inmunomarcación del virus de DVB en el pulmón de un animal con cultivo positivo. Las flechas indican áreas de reacción positiva.

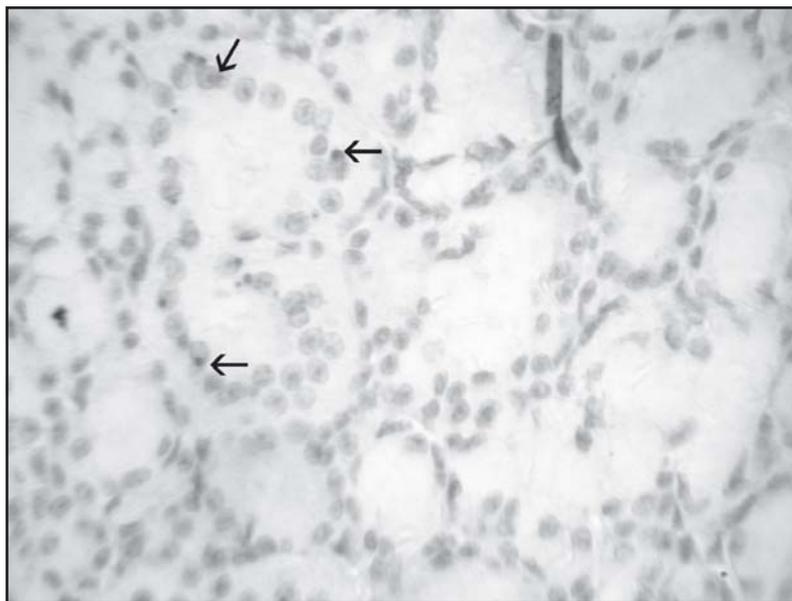


Figura 2. Inmunomarcación del virus de DVB en placenta. La flecha indica áreas de reacción positiva.

## DISCUSIÓN

Uno de los aspectos cruciales de la IHQ es la retención de los antígenos en los tejidos, en una conformación tal que puedan ser reconocidos por los anticuerpos. Como hemos mencionado, la reactividad de muchos antígenos es alterada por la fijación. Durante las últimas tres décadas, la IHQ se ha transformado en el método auxiliar más importante para la histopatología. Sin embargo, la estandarización de estas técnicas continúa siendo un problema. La calidad de la inmunomarcación depende principalmente de tres factores: 1) fijación y procesamiento de los tejidos; 2) desenmascaramiento de los determinantes antigénicos; y 3) sensibilidad de los sistemas de detección<sup>13</sup>.

El formaldehído induce la formación de uniones cruzadas entre proteínas, o entre proteínas y ácidos nucleicos, ocasionando el enmascaramiento de muchos determinantes antigénicos<sup>13</sup>. Por otra parte, el efecto de la deshidratación y la temperatura de inclusión en parafina, también pueden afectar la conformación o estabilidad de los antígenos tisulares.

Los determinantes antigénicos que han sido ocultados o alterados por el formaldehído pueden ser desenmascarados, recuperando su conformación. Como hemos mencionado, los métodos más comunes utilizados para esto, son los tratamientos proteolíticos o los basados en la utilización de métodos físicos como el calor o ultrasonido<sup>6, 12</sup>.

Nuestros resultados en relación a las ventajas de la proteinasa K coinciden con trabajos previos de Lértora et al.<sup>7</sup>, quienes trabajaron con muestras fijadas por corto tiempo en formol. Se ha publicado<sup>12</sup> que para algunas proteínas, los tratamientos de alta temperatura (como el microondas en nuestro

caso) pueden inducir una reacción negativa en la IHQ, lo que coincide con nuestros hallazgos.

En trabajos previos, otros autores han realizado pruebas similares. Belák et al.<sup>2</sup> realizaron la inmunodetección de antígenos del vDVB sobre tejidos fijados en alcohol mediante tres anticuerpos monoclonales en alta concentración (1:5). Allan et al.<sup>1</sup> utilizaron tratamiento con proteasas, y pudieron obtener reacción en cortes por congelación pero no resultados satisfactorios en materiales fijados en formol e incluidos en parafina. En este sentido, como ya hemos mencionado, la mayoría de los trabajos en este tema han sido realizados sobre materiales procesados por congelación, lo que haría inviable esta técnica para el diagnóstico de rutina en condiciones de trabajo «a campo»<sup>4,5,8,14</sup>.

## CONCLUSIONES

Como conclusión, podemos decir que la fijación formólica afecta la antigenicidad de la proteína E2 (gp53) del vDVB tipo 1 y 2. Sin embargo, estos efectos pueden ser revertidos por digestión proteolítica con proteinasa K previa a la incubación con los anticuerpos primarios. Esto permitiría la utilización de la IHQ con estos anticuerpos como técnica de rutina para el diagnóstico de la DVB y también la realización de estudios retrospectivos sobre material de archivo.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por la Universidad Nacional del Litoral a través del Programa CAID 2000, proyecto: Estudios comparativos entre aislamiento y técnicas inmunohistoquímicas para el virus de la diarrea viral bovina con diferenciación de tipos.

## BIBLIOGRAFIA

1. ALLAN, G.M.; MCNULTY, N.S.; BRYSON, D.; MACKIE, D.; PLATTEN, M. 1989. Demonstration of bovine virus diarrhoea virus antigen in formalin fixed, paraffin embedded tissue using a streptavidin / biotin technique. *Res. Vet. Sc.* 46: 416-418.
2. BELÁK, K.; GIMENO, E.J.; BELÁK, S. 1989. Demonstration of Bovine Viral Diarrhoea Virus Antigens in Cells Cultures and in Paraffin-embedded Tissue Sections by the Peroxidase-antiperoxidase (PAP) Technique Using Monoclonal Antibodies. *Arch. Vet. Scand.* 30: 230-233.
3. DEREGT, D.; PRINS, S. 1998. A monoclonal antibody based immunoperoxidase monolayer (microisolation) assay for detection of type I and type II Bovine Viral Diarrhoea Virus. *Can. J. Vet. Res.* 62: 152-155.
4. FRAY, M.D.; PRENTICE, H.; CLARKE, M.C.; CHARLESTON, B. 1998. Immunohistochemical evidence for the localization of Bovine Viral Diarrhoea Virus, a single stranded RNA virus in ovarian oocytes in the cow. *Vet. Pathol.* 35: 253-259.
5. FREDRIKSEN, B.; PRESS, C.M.C.; LOKEN, T.; ODEGAARD, S.A. 1999. Distribution of viral antigen in uterus, placenta and foetus of cattle persistently infected with bovine virus diarrhoea virus. *Vet. Microbiol.* 64: 109-122.
6. GIMENO, E.J.; MASSONE, A.R.; PORTIANSKY, E.L. 1998. Preembedding epitope retrieval. *Ap. Immunohistochem.* 6: 35-41.
7. LÉRTORA, J.; PAREDES, E.; REINHARDT, G.; ALBERDI, A. 2003. Inmunohistoquímica en biopsias de piel tratadas con proteinasa K y microondas para el diagnóstico en animales persistentemente infectados con el virus de la diarrea viral bovina. *Arch. Med. Vet.* 35: 23-36.
8. LIEBLER-TENORIO, E.M.; GREISER-WILKE, I.; PHOLENZ, J.F. 1997. Organ and tissue distribution of the antigen of the cytopathogenic bovine virus diarrhoea virus in the early and advanced phases of experimental mucosal disease. *Arch. Virol.* 142: 1613-1634.
9. OCCHI, H. 2003. Diarrea Viral Bovina. En: Luchter, F. *Introducción al estudio de las Enfermedades Infecciosas: Enfermedades Infecciosas de los Rumiantes.* Buenos Aires p 294-297.
10. ORTEGA, H.H.; LORENTE, J.A.; MIRA G.A.; BARAVALLE, C.; SALVETTI, N.R. 2004. Constant light exposure cause dissociation in gonadotrophins secretion and inhibits partially neuroendocrine differentiation of Leydig cells in adult rats. *Reprod. Dom. Anim.* 39: 417-423.
11. SANDVIK, T. 1999. Laboratory diagnostic investigations for bovine viral diarrhoea virus in cattle. *Vet. Microbiol.* 64: 123-134.
12. SHIN, T.; COTE, R.J.; TAYLOR, C.R. 2001. Antigen Retrieval Techniques: Current Perspectives. *J Histochem. Cytochem.* 49: 931-937.
13. WERNER, M. 1999. Tissue fixation and antigen retrieval. *Rev. Esp. Patol.* 32: 355-356.
14. WILHELMSEN, C.L.; BOLIN, S.R.; RIDPATH, J.F.; CHEVILLE, N.F.; KLUGE, J.P. 1991. Lesions and localization of viral antigen in tissues of cattle with experimentally induced or naturally acquired mucosal disease, or with acquired chronic bovine viral diarrhoea. *Am. J. Vet. Res.* 52: 269-275.
15. WOODS, A.; ELLIS, C.R. 1994. *Laboratory Histopathology: A Complete Reference.* Longman Group Limited. Londres.