

ARTICULO SOLICITADO

APLICACION EN PATOLOGIA VETERINARIA DE LAS TECNICAS INMUNOHISTOQUIMICAS I PARTE. TECNICAS DE INMUNOFLUORESCENCIA

Dr. M. Quezada O., M.V. Depto. Med. Veterinaria
Facultad de Ciencias Agrarias Veterinarias y Forestales
Universidad de Concepción Casilla 537 Chillán, Chile

Dr. A. Fernández R., M.V.

Dra. J. Martín De las Mulas, Méd.

Depto. Anat. y Anat. Patológica Comp. Facultad de Veterinaria
Universidad de Córdoba, España

Las técnicas inmunocitoquímicas aplicadas a la patología de las enfermedades de etiología infecciosa (parásitos, bacterias y virus), han tenido un gran avance en los últimos años, utilizándose en el diagnóstico anatomopatológico rutinario y en el estudio de la patogenia de las diferentes enfermedades infecciosas. Estas técnicas permiten identificar antígenos "in situ", mediante el desarrollo de una reacción antígeno anticuerpo específica, utilizando los correspondientes anticuerpos marcados con un colorante visible al microscopio (fluorocromo, enzima o metal pesado).

La posibilidad de obtener antisueros, tanto en conejos como en otros animales domésticos, frente a diferentes microorganismos, así como la adquisición del resto de los reactivos en el comercio, hace que estas técnicas diagnósticas puedan ofrecer importantes ventajas comparativas, frente a los altos costos que tienen los aislamientos y otras técnicas que se utilizan en los laboratorios de virología y microbiología.

Por otra parte, son frecuentes los aislamientos de varios microorganismos a partir de un cadáver. La posibilidad de utilizar estas técnicas sobre el mismo material en el que se realiza el estudio histopatológico, da una información complementaria al relacionar las lesiones tisulares con la presencia de microorganismos.

CAMPOS DE APLICACION DE LAS TECNICAS INMUNOHISTOQUIMICAS EN PATOLOGIA ANIMAL (Ref. 1-6, 8, 9, 11, 12)

La creciente oferta que tiene el mercado de anticuerpos específicos para identificar y localizar diferentes componentes biológicos en las células y tejidos, así como el desarrollo de nuevas técnicas y mejoramiento de las ya existentes, constituyen una excelente herramienta diagnóstica en los laboratorios de Anatomía Patológica, ya que permite realizar estudios morfoetiológicos e incluso retrospectivos, al poder utilizar material previamente fijado en formol, e incluido en parafina, el cual ha estado almacenado por años.

En general las técnicas inmunohistoquímicas se pueden aplicar en:

1. Identificación de células: por ej. linfocitos (B y T), macrófagos y células dendríticas. En algunas enfermedades infecciosas se puede realizar un doble marcaje el cual permite reconocer las células infectadas y el antígeno.
2. Diagnóstico de algunas neoplasias: por ej. identificación de hormonas (neoplasias hormono-productoras), constituyentes del citoesqueleto.
3. Identificar componentes que participan en reacciones de hipersensibilidad: por ej. inmunoglobulinas, complemento y sus fracciones.

4. Procesos infecciosos: por ej. parásitos, protozoos, hongos, bacterias y virus.

En relación con este último punto se hace necesario resaltar las enormes ventajas de costo y tiempo que significa la utilización de técnicas inmunohistoquímicas, como sucede con *Mycoplasma hyopneumoniae* (Neumonía Enzoótica del cerdo), microorganismo que necesita condiciones especiales de cultivo y largos períodos de crecimiento para su identificación. Situación similar ocurre con los virus, los cuales además tienen el inconveniente que su presencia en los tejidos no siempre se puede demostrar con técnicas histoquímicas.

PROCEDIMIENTOS Y PRINCIPALES TÉCNICAS INMUNOHISTOQUÍMICAS (REF. 2, 10-12)

La inmunofluorescencia (IF), es la más conocida de estas técnicas, probablemente porque viene empleándose desde hace más de 40 años. Sin embargo, en la actualidad existen técnicas que empiezan a utilizarse más ampliamente, debido a las grandes ventajas comparativas que ofrecen respecto a la IF.

Todas las técnicas inmunohistoquímicas tienen un paso fundamental que consiste en exponer el antígeno que se desea demostrar, frente a un anticuerpo específico, lo que dará origen a un enlace altamente selectivo antígeno-anticuerpo. Para detectar el lugar de depósito del anticuerpo, éste debe "marcarse" con algún producto visible al microscopio, mediante técnicas directas o indirectas.

Las técnicas inmunohistoquímicas se clasifican según dos aspectos:

1. Método utilizado:

- Método directo.
- Método indirecto.

2. Marcador de Anticuerpos:

- Técnicas de inmunofluorescencia.
- Técnicas inmunoenzimáticas.
- Técnicas inmunometálicas.

Método (Ref. 1-3, 7, 9, 10)

- Métodos directos: son procedimientos muy sencillos, en los que se utiliza el anticuerpo específico frente al antígeno que se desea demostrar, conjugado con el marcador.

- Métodos indirectos: se utilizan a lo menos dos anticuerpos. El primero es específico frente al antígeno (anticuerpo primario), pero no está conjugado con el marcador, siendo necesario aplicar un segundo anticuerpo conjugado con el marcador (anticuerpo secundario). Los anticuerpos secundarios deben ser desarrollados frente al anticuerpo primario, en una especie animal diferente en la que fue creada el anticuerpo primario (heterólogo).

Existen diversas variantes de los métodos indirectos, con sus ventajas y sus inconvenientes, por lo que se debe elegir en cada caso el procedimiento más idóneo.

En términos generales la cadena de pasos que permite alcanzar el "marcador" (dos, tres, incluso cuatro) en una misma técnica, se puede lograr de dos formas:

- Por uniones específicas antígeno-anticuerpo: por ej. método de la peroxidasa antiperoxidasa (PAP).
- Por uniones altamente específicas, distintas de las uniones antígeno-anticuerpo, o bien mediante la participación de ambos tipos: por ej. método de la Avidina Biotina Peroxidasa (ABC).

Los métodos indirectos son más laboriosos, pero aventajan a los directos, en que no necesitan disponer del anticuerpo primario marcado, de tal suerte que adquiriendo los kits adecuados en el comercio, se puede realizar la técnica para diversos antígenos, si se dispone de los anticuerpos específicos desarrollados en una misma especie animal.

TECNICAS DE INMUNOFUORESCENCIA (REF. 1, 2, 10-13)

Las técnicas de inmunofluorescencia se basan en la utilización de conjugados de inmunoglobulinas con fluorocromos, visibles al microscopio de fluorescencia. Los fluorocromos deben ser de gran pureza. Los más utilizados son el isotiocianato de fluorescencia (FITC), y el isotiocianato de tetrametil rodamina (TRITC).

En los estudios de inmunofluorescencia los mejores resultados se obtienen cuando se realizan los cortes histológicos por congelación, pero también se obtienen buenos resultados en cortes de tejidos fijados en formol e incluidos

en parafina. En tales casos debe hacerse un tratamiento de las preparaciones con enzimas proteolíticas, con el fin de desenmascarar grupos antigénicos que podrían haber quedado ocultos, al momento de la fijación. También debe tenerse en consideración que algunos fijadores, como el formol o el glutaraldehído, inducen la presencia de fluorescencia inespecífica, debido a la existencia de grupos aldehídos libres, sumado esto a cierto grado de autofluorescencia que poseen determinadas estructuras tisulares.

Básicamente, se puede realizar una técnica de inmunofluorescencia directa, de gran utilidad en enfermedades inmunitarias en las cuales existe depósito de complejos antígeno-anticuerpo, factores del complemento, fibrinógeno, etc. o una técnica de inmunofluorescencia indirecta muy útil cuando la emisión lumínica del fluorocromo es débil, dada la mínima cantidad de antígeno presente en el tejido (la capa intermedia de anticuerpos sin conjugar multiplica el número de sitios a los cuales los anticuerpos marcados pueden unirse).

Cualquiera que sea el procedimiento empleado deben utilizarse siempre cortes controles para garantizar la fiabilidad de la técnica y descartar la autofluorescencia y fluorescencia inespecífica entre otras.

Se puede emplear como controles

- Preparación sin teñir, para descartar autofluorescencia.
- Incubación con suero no inmune, del mismo animal.
- Incubación, sólo con el segundo anticuerpo.
- Incubación con suero normal conjugado, del mismo animal, correspondiente al segundo anticuerpo.
- Control positivo.

Para realizar en forma adecuada cualquiera de las técnicas de IF se debe hacer un número mínimo de pasos, que en los cortes por congelación serían los siguientes (Palacin, 1984):

Método directo

1. Cortes en congelación, desecados.
2. Lavado en PBS pH 7,2 (10-15 min.).
3. Incubación con anticuerpo específico marcado con fluorocromo (30-60 min.).
4. Lavado con PBS pH 7,2 (3 x 10 min.).
5. Montaje.

Método indirecto

1. Cortes en congelación desecados.
2. Lavado en PBS pH 7,2 (10-15 min.).
3. Anticuerpo específico primario, no marcado (30-60 min.).

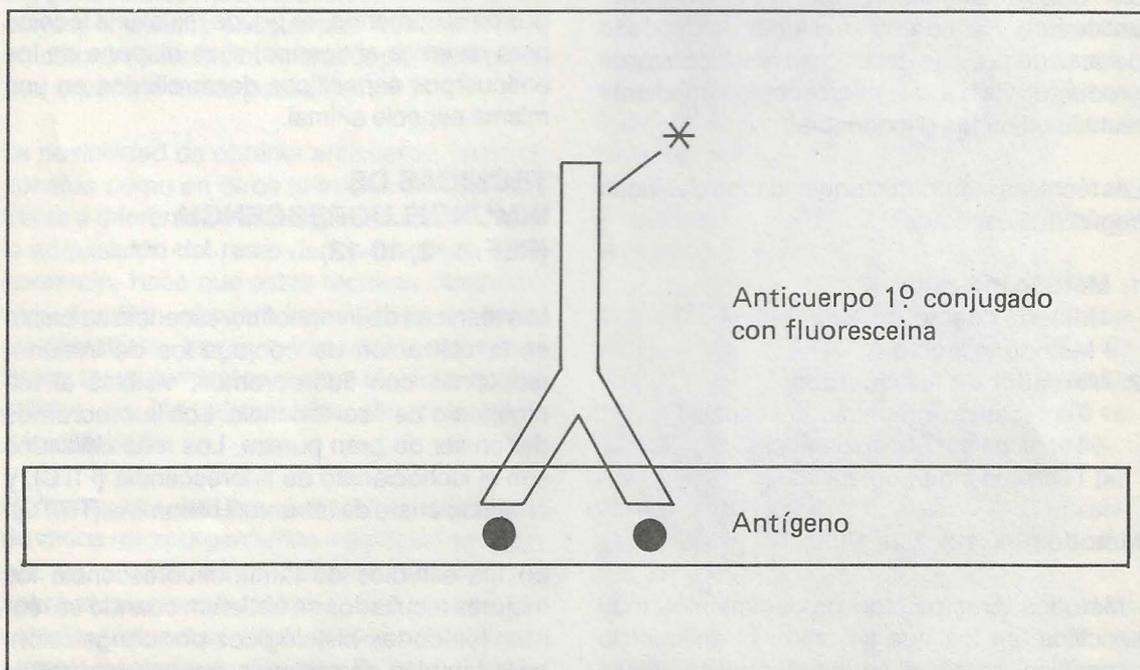


Figura 1. Método de la inmunofluorescencia directa.

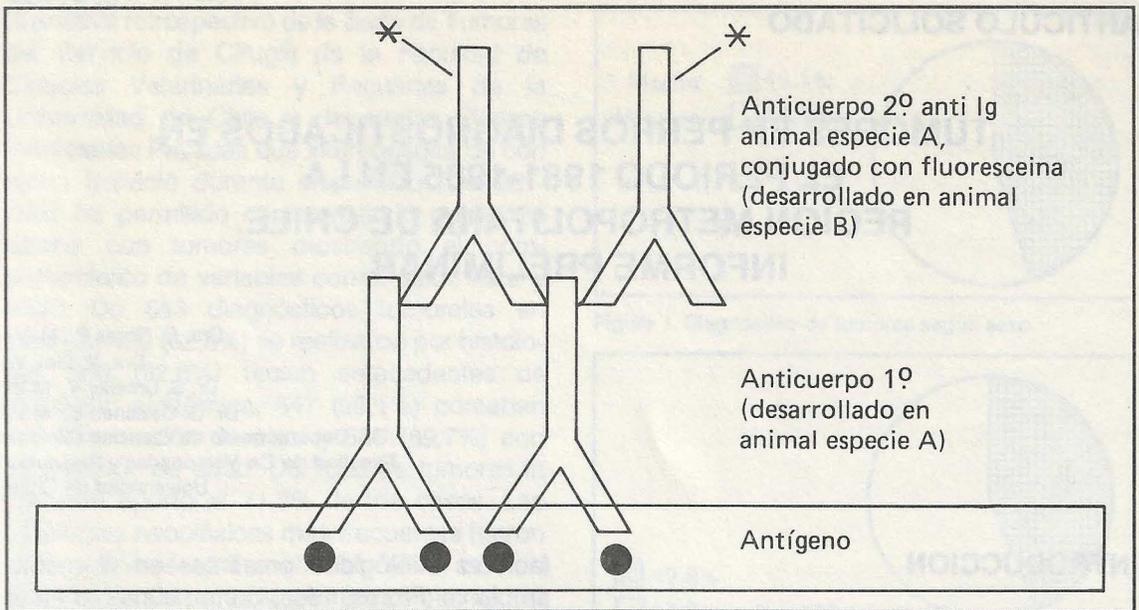


Figura 2. Método de inmunofluorescencia indirecta.

4. Lavado PBS pH 7,2 (3 x 10 min.).
5. Anticuerpo secundario, marcado con fluorocromo (30 min.).
6. Lavado con PBS pH 7,2 (3 x 10 min.).
7. Montaje.

El medio de montaje debe ser no fluorescente y, su pH, debe estar entre 7 y 8,6 (a pH alto, mayor emisión lumínica). Una desventaja de la IF es que las preparaciones procesadas deben observarse inmediatamente al microscopio para evitar que la emisión lumínica del fluorocromo disminuya, o mejor en el congelador. Se pueden obtener buenas fotografías si se usan películas de alta sensibilidad.

BIBLIOGRAFIA

1. AMANFU, W.; WENG, C.N.; ROSS, R.E. and BARNES, H.J. "Diagnosis of mycoplasma pneumoniae of swine: Sequential study by direct immunofluorescence". *Am. J. Vet. Res.* 45: 1349-1352, 1984.
2. FENNER, F.; BACHMANN, P.; GIBBS, E.; MURPHY, F.; STUDDERT, M. and WHITE, D. "Veterinary virology". Academic Press, Inc. Ltd. USA, 1987.
3. FERNANDEZ, A.; MARTIN DE LAS MULAS, J.; POVEDA, J.; TOLEDO, V. y MENDEZ, A. "Aplicación de técnicas inmunocitoquímicas al diagnóstico de la enfermedad de Aujeszky en material fijado". *Anaporc* 76: 26-27, 1988.
4. GUY, J.S. "Diagnosis of canine viral infections". *Vet. Clinics of North America: Small Animal Practice* 16: 1145-1156, 1986.
5. JOHNSON, K.P.; SVOVELAND, P.T.; EMMONS, R.W. "Diagnosis of rabies by immunofluorescent in trypsin-treated histologic sections". *T. Am. Med. Assoc.* 244: 41-43, 1980.
6. LEMAN, A.D.; GLOCK, R.D.; MENGELING, W.L.; PENNY, R.H.; SCHOLL, E. and STRAW, B. "Diseases of swine". Fifth edition. The Iowa State University Press. USA, 1984.
7. MEADOR, U.P.; TABATABAI, L.B.; HAGEMOSER, W.A.; DEYOE, B.L. "Identification of Brucella abortus in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues of cows, goats, and mice with an avidinbiotin-peroxidase complex immunoenzymatic staining technique". *Am. J. Vet. Res.* 47: 2147-2150, 1986.
8. MINGUEZ, J.; RUEDA, A.; DOMINGUEZ, J. and SANCHEZ-VIZCAINO, J.M. "Double labeling immunohistological study of African swine fever virus-infected spleen and lymph nodes". *Vet. Pathol.* 25: 193-198, 1988.
9. MOORE, A.S.; MADEWELL, B.R. and LUND, J.K. "Immunohistochemical evaluation of intermediate filament expression in canine and feline neoplasms". *Am. J. Vet. Res.* 50: 88-92, 1989.
10. MORILLA, A. y BAUTISTA, C. "Manual de Inmunología". Editorial Diana, México, 1986.
11. OTT, R.L. "Diagnosis of feline viral infection". *Vet. Clinics of North America: Small Animal Practice* 16: 1157-1170, 1986.
12. PALACIN, F.A. "Técnicas inmunohistoquímicas". Editorial Atom S.A. Barcelona (España), 1984.
13. PALMER, D.G.; OSSENT, P.; SUTER, M.M. and FERRARI. "Demonstration of rabies antigen in paraffin tissue sections: comparison of the immunofluorescence technique with the unlabeled antibody enzyme method". *Am. J. Vet. Res.* 46: 283-286, 1985.