

UNIVERSIDAD DE VALPARAÍSO  
FACULTAD DE MEDICINA  
CARRERA DE TECNOLOGÍA MÉDICA

**“Virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa (Virus IPN): Ensayo de tropismo viral  
en órganos de Trucha Arcoíris”**

Trabajo de Titulación presentado en conformidad a los requisitos para obtener el  
Grado Académico de “Licenciado en Tecnología Médica con mención en  
Morfofisiopatología y Citodiagnóstico”

Francesca Carolina Norero Pineda

Profesor Guía: TM M Cs Juan Carlos Espinoza

2006

## i.-AGRADECIMIENTOS

Muchas han sido las personas que de una u otra forma han colaborado en la realización de este trabajo. El camino ha sido difícil, pero todo se ha hecho más liviano con la ayuda desinteresada de todos ustedes.

Mis agradecimientos a la Sra. Myriam Leiva Silva, de la piscicultura de Río Blanco, Los Andes y al Señor Mariano Segovia, por su colaboración en los tramites requeridos para el traslado de los peces.

A mi profesor guía, Juan Carlos Espinoza, por la constante entrega de conocimientos, por creer en mí y en mis capacidades aún sin conocerme, cuando llegué por primera vez a golpear las puertas del laboratorio. Espero haber estado a la altura de la situación, he puesto todos mis esfuerzos en retribuirles todo lo entregado.

Al Dr. Raúl González, Jefe del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Gustavo Fricke y del Servicio de Histopatología de Centromed, mis más profundos agradecimientos por confiar en mí y permitirme utilizar los equipos e instrumental de ambos servicios.

A la TM Sra. María Soledad Mandiola, por su infinita colaboración, por guiarme con su experticia técnica, destinando parte de su tiempo a asistirme y enseñarme, por facilitarme instrumentos y materiales que de otro modo me era imposible conseguir. Mis sinceros agradecimientos para usted.

Al Dr. David Cabrera, médico Patólogo del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Gustavo Fricke, por la caracterización de las placas histológicas, lo que sin duda me ha permitido entregar resultados de mucha mayor calidad. Gracias por el tiempo, el apoyo y los conocimientos entregados, de corazón.

A todos quienes han aportado su grano de arena en este proyecto. Al profesor Juan Kuznar, por preocuparse de mantenerme informada en cuanto respecta al virus, por los papers, por los conocimientos, por el tiempo. Al profesor y jefe de mención Andrés Ibarra, porque, a pesar de las dificultades, siempre ha luchado porque seamos los mejores. A Claudia Jofré, por su tremenda voluntad. A José, Heriberto, Marlén, del Servicio de Anatomía patológica del Hospital Gustavo Fricke. A la Sra. Nina, del laboratorio de Bioquímica y Virología de la Universidad de Valparaíso. A Margarita, Ximena y Lissette, de la sección administrativa de la carrera de Tecnología Médica, por su buena voluntad para atendernos, por el apoyo.

A Alejandro Leighton, porque él bien sabe que todo esto no hubiera sido posible sin él, mis sinceros agradecimientos

A todos ustedes mis infinitos agradecimientos por hacer esto posible.

A los precursores de mis sueños, este logro es para ustedes...

## ii-.DEDICATORIA

A René Norero Soto, mi padre, mis logros para ti  
A Cecilia Pineda Soto, mi madre, mi amiga, mi apoyo  
A Rigo, mi compañero, mi fuerza, mi sonrisa  
A Tita, más allá de la vida, siempre serás parte de mi corazón  
A Rodrigo Gálvez, la vida se apaga, los grandes amigos nunca

### iii-.RESUMEN

El virus de la necrosis pancreática infecciosa – virus IPN- es un agente infeccioso que infecta peces jóvenes, principalmente salmónidos y produce una muy alta mortandad, de alrededor de un 90%, en su fase aguda. Ocasionando severas pérdidas a la economía nacional.

El siguiente trabajo, demuestra la unión de partículas virales de virus IPN a cortes de tejido de órganos congelados de alevines de *Onchorinchus mykiss* – trucha Arcoíris - utilizando inmunofluorescencia indirecta, poniendo a punto una técnica de adsorción del virus.

La elección de la técnica de inmunofluorescencia indirecta para el desarrollo de esta investigación presenta clara relación con sus propiedades y ventajas como método diagnóstico, además de los resultados obtenidos con la experiencia en el Laboratorio de Bioquímica y Virología de la Universidad de Valparaíso.

Se observó y comparó la unión del virus a las células de los distintos tejidos estudiados, encontrándose diferencias de unión de partículas virales, entre órganos.

Estos resultados serían de ayuda en el diseño de antivirales destinados a tratar y combatir la enfermedad. Orientando, posteriormente, el estudio de la entrada del virus y su amplificación en estas células que, probablemente, cuenten con mayor número de receptores de membrana selectivos para la entrada del virus IPN.

**PALABRAS CLAVES:** virus IPN, adsorción, Inmunofluorescencia Indirecta, anticuerpos monoclonales, órganos de pez.

## iv-.ÍNDICE

Portada	pág. 1
i-. Agradecimientos	pág. 2
ii-. Dedicatoria	pág. 3
iii-. Resumen	pág. 4
iv-. Índice	pág. 5
v.- Índice de tablas	pág. 7
vi.- Índice de figuras	pág. 7
CAPÍTULO 1 – INTRODUCCIÓN	pág. 9
1.1.- Antecedentes y motivación	pág. 10
1.2.- Descripción del problema	pág. 10
1.3.- Solución propuesta	pág. 14
1.3.1.- Características de la solución	pág. 14
1.3.2.- Propósitos de la solución	pág. 16
1.4.- Objetivos y alcances del proyecto	pág. 17
1.4.1.- Objetivo general	pág. 17
1.4.2.- Objetivos específicos	pág. 17
1.4.3.- Alcances	pág. 17
1.5.- Metodología y herramientas utilizadas	pág. 18
1.5.1.- Metodología a utilizar	pág. 18
1.5.2.- Herramientas de desarrollo	pág. 20
1.5.3.- Ambiente de desarrollo	pág. 20
1.6.- Resultados Obtenidos	pág. 21
CAPÍTULO 2 – DESARROLLO DEL TEMA	pág. 24
2.1.- Fundamentos teóricos y estado del arte del problema	pág. 25
2.1.1.- Fundamentos teóricos	pág. 25
2.1.2.- Estado del arte	pág. 26

2.2.- Descripción de los métodos utilizados	pág. 27
2.2.1.- metodología de traslado y manutención peces	pág. 27
2.2.2.- metodología del estudio exploratorio del pez	pág. 31
2.2.3.- metodología de las técnicas para estudio histológico	pág. 33
2.2.3.1.- Protocolo tinción H-E	pág. 34
2.2.3.2.- Protocolo tinción Van Gieson	pág. 35
2.2.4.- metodología de infección y detección por IFI	pág. 36
2.3.- Desarrollo de la solución	pág. 40
2.3.1.- Análisis de la solución	pág. 40
2.3.2.- Diseño, construcción y pruebas	pág. 41
2.4.- exposición de resultados	pág. 43
2.4.1.- de la disección y examinación macroscópica	pág. 43
2.4.2.- de la examinación histológica de rutina	pág. 44
2.4.3.- de la infección y detección por IFI	pág. 50
2.5.- Discusión de los resultados	pág. 58
2.6.- Conclusiones	pág. 59
vii.-Referencias	pág. 61

## v.- ÍNDICE DE TABLAS:

1.1.- Tabla comparación métodos de diagnóstico	pág. 16
2.1.- Tabla número promedio de partículas virales por campo	pág. 59

## vi.- ÍNDICE DE FIGURAS:

## CAPÍTULO 1:

1.1.- Esquema estructura virus IPN	pág. 11
1.2.- Microfotografía electrónica tinción negativa virus IPN	pág. 11
1.3.- Microfotografías electrónicas endocitosis Aquabirnavirus	pág. 12
1.4.- Esquemización de la entrada del virus y su replicación	pág. 12
1.5.- Peces infectados presentando signología aguda	pág. 13
1.6.- Esquema general de metodología utilizada en IFI	pág. 15

## CAPÍTULO 2:

2.1.- Esquema producción anticuerpos monoclonales	pág. 26
2.2.- Esquema de protocolo de traslado	pág. 28
2.3.- Fotografías del traslado de los peces	pág. 29
2.4.- Tamaño promedio de los alevines	pág. 29
2.5.- Manutención de la acuario	pág. 31
2.6.- Esquema metodología de disección de peces	pág. 32
2.7.- Disección de los alevines	pág. 33
2.8.- Procesamiento de las muestras	pág. 36
2.9.- Procesamiento de los órganos para IFI	pág. 37
2.10.- Metodología de la incubación de los cortes de tejido	pág. 37
2.11.- Fotografías proceso de infección e IFI	pág. 39
2.12.- Esquemización metodología utilizada para IFI	pág. 40
2.13.- Representación virus IPN – anticuerpos en IFI	pág. 41
2.14.- Esquemización de utilización de controles negativos	pág. 42
2.15.- Esquema de la anatomía interna de salmónidos	pág. 43
2.16.- Resultado de la disección	pág. 43
2.17.- Fotografías cortes riñón con rutina. H-E y VG, 400x	pág. 45

2.18.- Fotografías cortes de corazón con rutina. H-E y VG, 400x	pág. 45
2.19.- Fotografías cortes de cerebro con rutina. H-E y VG, 400x	pág. 46
2.20.- Fotografías cortes de bazo con rutina. H-E y VG, 400x	pág. 46
2.21.- Fotografías cortes de estómago con rutina. H-E y VG, 400x	pág. 47
2.22.- Fotografías cortes de ciegos pilóricos. H-E y VG, 400x	pág. 47
2.23.- Fotografías cortes de hígado con rutina. H-E y VG, 400x	pág. 48
2.24.- Fotografías cortes de hígado con rutina. H-E y VG. 100x	pág. 48
2.25.- Fotografía de partículas virales con fluorescencia	pág. 49
2.26.- Fotografía de localización de partículas virales I	pág. 50
2.27.- Fotografía de localización de partículas virales II	pág. 51
2.25.- Fotografía corte de bazo con virus IPN mediante IFI	pág. 52
2.26.- Localización de partículas virales I	pág. 52
2.27.- Localización de partículas virales II	pág. 51
2.28.- Fotografía corte de bazo con virus IPN mediante IFI	pág. 52
2.29.- Fotografía corte de bazo con IFI. Control negativo	pág. 52
2.30.- Fotografía corte de hígado con virus IPN mediante IFI	pág. 53
2.31.- Fotografía corte de hígado con IFI. Control negativo	pág. 53
2.32.- Fotografía corte de corazón con virus IPN mediante IFI	pág. 54
2.33.- Fotografía corte de corazón con IFI. Control negativo	pág. 54
2.34.- Fotografía corte de ciegos pilóricos con virus IPN mediante IFI	pág. 55
2.35.- Fotografía corte de ciegos pilóricos con IFI. Control negativo	pág. 55
2.36.- Fotografía corte de riñón con virus IPN mediante IFI	pág. 56
2.37.- Fotografía corte de riñón con IFI. Control negativo	pág. 56

## **CAPÍTULO 1-. INTRODUCCIÓN**

## 1.1.- ANTECEDENTES Y MOTIVACIÓN

El virus IPN es el agente causal de una infección altamente contagiosa que infecta a peces jóvenes, principalmente salmónidos, produciendo una muy alta mortandad, de alrededor de un 90%, en su fase aguda (Dorson, 1982). Esto se traduce en importantes pérdidas económicas para el país, dado que Chile y Noruega son los principales productores de salmónidos a nivel mundial.

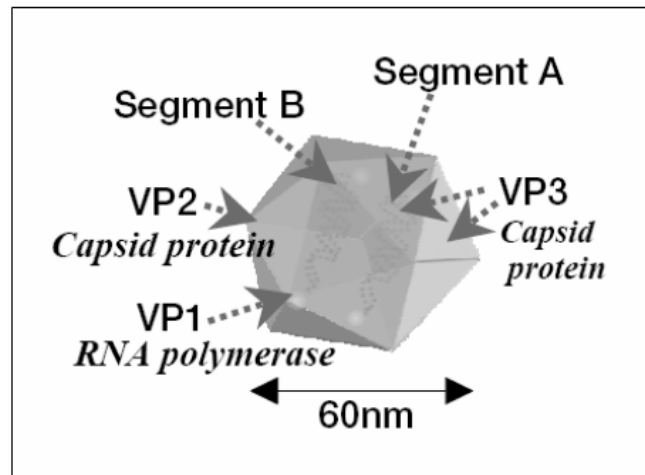
Aún se desconocen ciertos aspectos de la relación virus-pep, como la forma de transmisión, la existencia y virulencia de distintas cepas del virus y la posibilidad de que existan otros vectores biológicos que tengan un rol más activo en su diseminación. Además no existe acuerdo entre los distintos autores sobre la aparición de ciertos signos clínicos, tampoco, sobre los hallazgos histológicos. (Rodríguez Saint-Jean et. al, 2004)

La técnica de inmunofluorescencia ha sido reconocida como una de las más específicas en cuanto a identificación del virus, incluso ante bajos títulos virales (Rodríguez Saint-Jean et. al, 2004). El grueso de las investigaciones se ha realizado en base a cultivos celulares o improntas de órganos infectados, de allí la inquietud de aplicar la técnica en cortes de tejido de pep, que nos permita determinar, *in situ*, cual es el grado de unión del virus, al ser incubado, sobre los cortes de tejido previamente cortados por congelación. Con el fin de establecer alguna predilección del virus por los órganos del pep.

## 1.2.- DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA

El Virus IPN Es un virus icosaédrico de 600 A de diámetro y de un peso molecular de  $55 \times 10^6$  Da. No presenta envoltura lipídica externa.

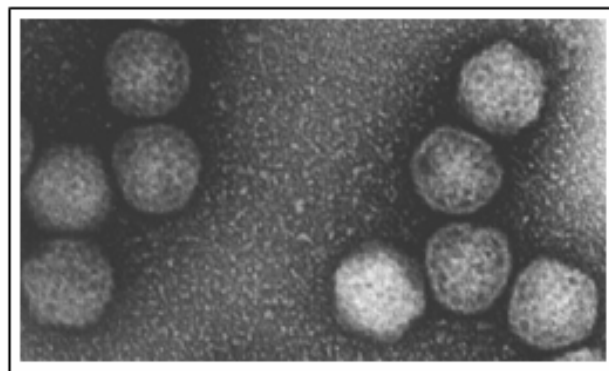
Pertenece a la familia *Birnaviridae*. La partícula viral consta de dos segmentos bicatenarios de RNA. Se compone de: una RNA polimerasa RNA dependiente (proteína VP1), dos proteínas no estructurales, VP4 que es una proteasa y VP5, que se discute en estos momentos sus propiedades y dos proteínas estructurales; VP2 que constituye la proteína mayoritaria de la cápside y VP3. (Duncan y Dobos, 1986; Duncan, et al 1991).



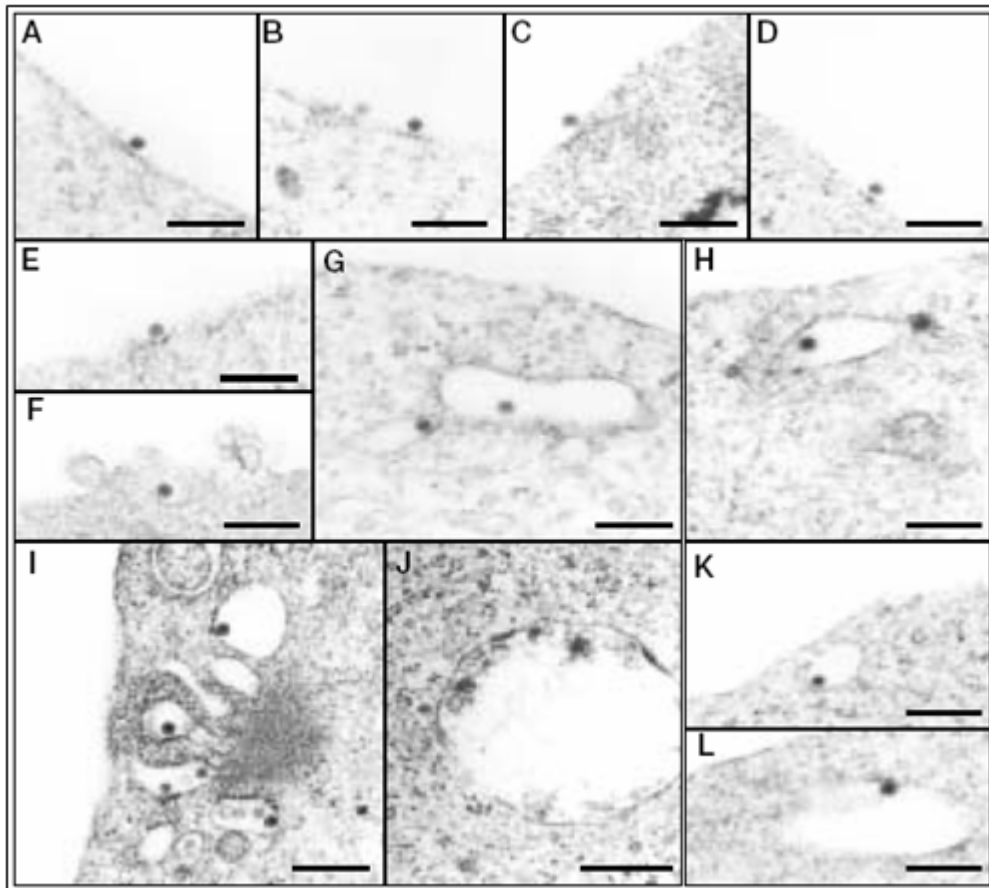
*Figura 1.1.-*Dibujo esquemático de la estructura del virus IPN. Segmento A del RNA, Segmento B del RNA y VP1 se encuentran dentro de la cápside (Oshima y col., 2005)

El virus purificado se une a polipéptidos de alto peso molecular (sobre 100 kDa) de la membrana celular de las células de estos peces, tanto específicos como no específicos, los que constituyen sus receptores (Kuznar et. al., 1995). Investigaciones acerca de la unión del virus, han demostrado que este satura los sitios de unión a las 2 a 3 horas post infección, a 4°C y que la proteína estructural VP2 sería la responsable de la unión con los receptores de la membrana celular.

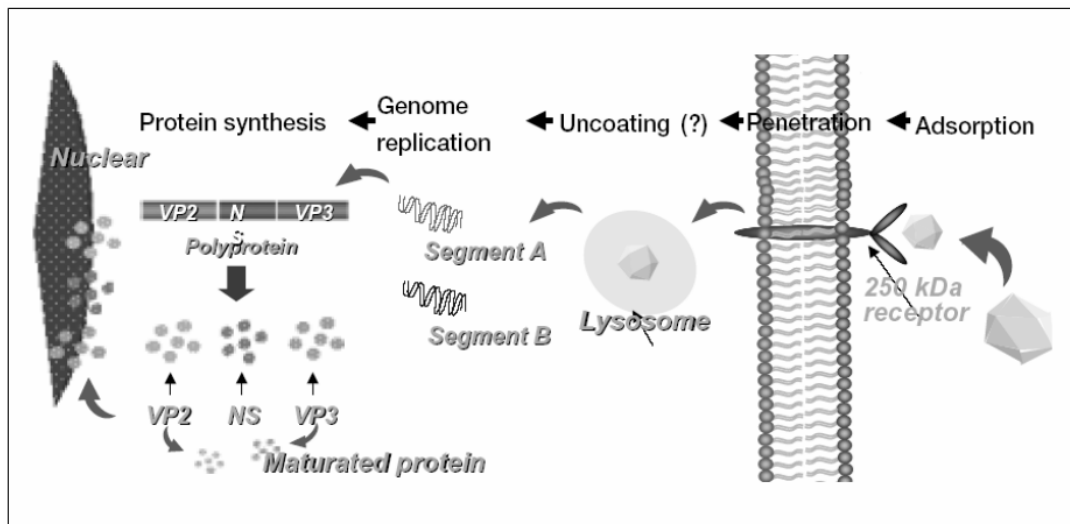
Investigaciones realizadas en la Universidad de Valparaíso han demostrado que el virus IPN entra a la célula por endocitosis (Couve y col. 1992), a través de receptores específicos de superficie (Kuznar y col. 1993). Antiguamente se creía que para la entrada del virus era requerida la existencia de un pH ácido sin embargo se ha descartado el rol del del pH endosomal en la infección (Espinoza y Kuznar, 1997).



*Figura 1.2.-* Microfotografía electrónica de tinción negativa de virus IPN. (Everitt, et.al., 2003)



*Imagen 1.3.-* Microfotografías electrónicas de la secuencia de endocitosis de Aquabirnavirus, en orden alfabético. (Oshima y col., 2005)



*Imagen 1.4.-* Representación esquemática del desarrollo de la infección desde su unión y entrada a la célula. (Oshima y col., 2005)

La replicación del Virus IPN ocurre en el citoplasma de las células susceptibles, y su ciclo es de aproximadamente 16 a 20 horas post infección (hpi). Tras lo cual nuevos viriones pueden iniciar un nuevo ciclo infeccioso.

La infección se manifiesta en las células con un dramático efecto citopático (CPE). (Dorson, 1982).

La síntesis de proteínas virales puede ser detectada tempranamente mediante inmunofluorescencia, alrededor de las 4 hpi, y la síntesis total de RNA viral alcanza su máximo entre las 8 y 10 hpi (Espinoza y Kuznar, 2002; Dobos, 1995)

Entre los signos clínicos que se sugieren durante la etapa aguda, destacan: expulsión de finas hebras de falsas heces en el agua, branquias pálidas y pequeñas hemorragias en la base de las aletas (H.-H Reichenbach y Klinke, 1982). En la etapa final los peces se oscurecen y exhiben notable exoftalmia y abultamiento de la parte abdominal. Los peces agónicos, nadan girando en torno a su propio eje, tras lo cual yacen en el fondo haciendo intensos movimientos de aspiración (Roberts, 1980).



*Imagen 1.5.-* Peces infectados experimentalmente en el laboratorio de Virología y Bioquímica de la Universidad de Valparaíso, presentando la signología aguda típica de la enfermedad, visible exoftalmia, abultamiento abdominal y oscurecimiento.

Microscópicamente, dentro de los efectos citopáticos reconocidos, destaca la aparición de focos necróticos en las células acinares del páncreas que presentan inclusiones intracitoplasmáticas, picnosis y cariorrexis (Fryer, 1981). Se sugiere que pueden verse comprometidos también órganos hematopoyéticos, como por ejemplo el riñón en su porción anterior, sin embargo, sobre esto no hay acuerdo entre los distintos autores.

El virus es estable ante el calor, el cloroformo y los ácidos. Es capaz de conservar su virulencia por lo menos durante 8 semanas a 10°C en agua destilada y en las aguas duras o blandas de los estanques (Wedemeyer et al., 1978); También resiste la desecación al aire durante 5 semanas (Desautels y Mackelvie, 1975). En condiciones de laboratorio el virus IPN ha sido expuesto a temperaturas que van desde - 80 a + 20°C sin presentar variaciones en su título viral, al igual que salinidades entre 0 y 40 psu que tampoco alteran la estabilidad del virus (Mortensen et al, 1998)

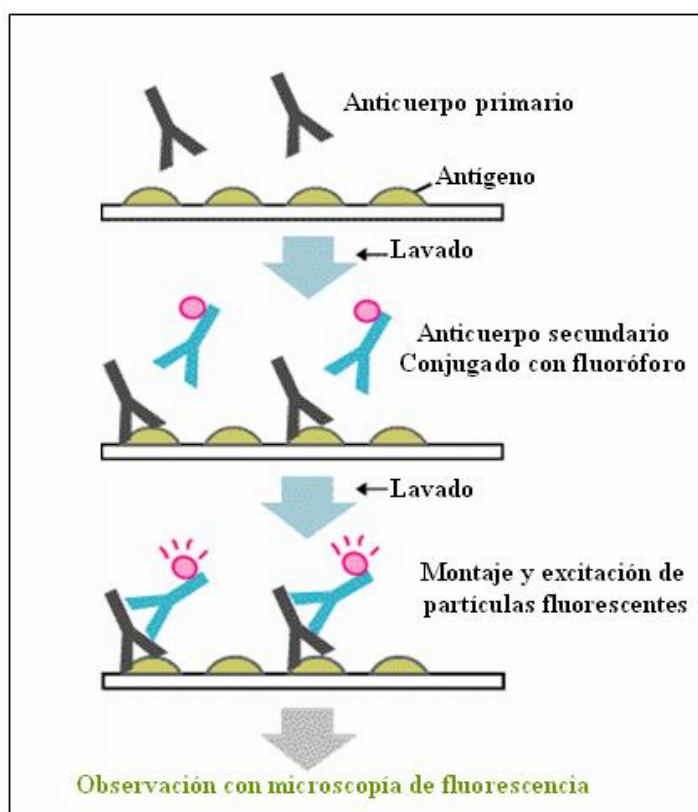
### **1.3.- SOLUCIÓN PROPUESTA**

#### **1.3.1.-Características de la solución**

La solución consistirá entonces en la incubación del virus IPN a título previamente estandarizado, sobre cortes de tejido de órganos sanos de trucha arcoíris previamente cortados en crióstato por congelación, tras lo cual se realizará la detección de las partículas virales a través de Inmunofluorescencia Indirecta, con la finalidad de determinar si es posible la unión del virus a los cortes de tejido congelado y permitiendo además hacer un estudio comparativo acerca de las diferencias de unión entre los distintos órganos en estudio.

El método de inmunofluorescencia indirecta consiste en la utilización de un anticuerpo primario, el cual reconoce una de las proteínas estructurales del virus, que tras una incubación y posterior lavado es identificado por un segundo anticuerpo que se encuentra conjugado con un fluoróforo, en este caso isotiocianato de fluoresceína (FITC), cuya señal puede ser observada bajo un microscopio de fluorescencia,

utilizando filtros de excitación y de emisión apropiados para las respectivas longitudes de onda, recomendadas para el uso del fluoróforo.



*Imagen 1.6.- Esquema general de la metodología utilizada en IFI*

Algunas moléculas como la rodamina o la fluoresceína pueden ser conjugadas a los anticuerpos, sin alterar sus propiedades biológicas o inmunológicas. Esta técnica es, por tanto, la más indicada para el diagnóstico de virus IPN, puesto que combina la sensibilidad y la especificidad de la unión antígeno-anticuerpo, con la precisión del microscopio de fluorescencia (Beesley, 1993).

Las principales ventajas de la técnica radican en su rapidez, especificidad, sensibilidad y reproducibilidad, detectando el virus incluso a títulos muy bajos como puede verse en el cuadro 1, donde el método de inmunofluorescencia figura como el método más sensible a bajos títulos de virus IPN, entre los métodos utilizables directamente en tejido del pez, detectando un 100% a un título  $1 \times 10^3$  TCID<sub>50</sub>/ml (Rodríguez Saint-Jean et. als, 2004). La técnica es recomendada por la organización internacional de Epizootias (OIE) para el diagnóstico del virus IPN.

*Tabla 1.1* - comparación entre 6 métodos de detección testeados y ensayo de neutralización para la detección del virus IPN a títulos infectivos extremos.

Título infectivo del virus log <sub>10</sub> TCID <sub>50</sub> /ML	Número de pruebas con detección positiva usando ensayo De neutralización	Técnica utilizada					
		IFA	FC	IP	IDB	ISPA	RT-PCR
1	5	0	0	0	0	0	100
2	15	26.7	80	0	0	0	100
3	9	100	100	22.2	0	0	100
4	25	100	100	100	92	0	100
5	7	100	100	100	100	71.4	100
6	14	100	100	100	100	71.4	100
7	3	100	100	100	100	100	100
8	5	100	100	100	100	100	100

Donde: IFA corresponde a técnica de inmunofluorescencia; FC a citometría de flujo; IP al test de inmunoperoxidasa (inmunohistoquímica); IDB representa inmunoblot; ISPA refiere al método inmunoestafilococo-proteína A y RT-PCR al método de transcripción inversa de la reacción en cadena de la polimerasa.

Para controlar la técnica de IFI se tomará un corte de cada placa como control negativo, el cual no será infectado con el virus pero, recibirá igualmente el tratamiento posterior con los anticuerpos para verificar si existe algún tipo de unión inespecífica.

### **1.3.2.- Propósitos de la solución**

El objetivo principal es determinar si es posible la observación de partículas virales mediante Inmunofluorescencia Indirecta, en cortes de tejido realizados por congelación previamente infectados con virus IPN. Con ellos se verificará si hay adsorción del virus. Se reconocerán partículas virales y no sus productos posteriores.

## **1.4.- OBJETIVOS Y ALCANCES DEL PROYECTO**

### **1.4.1.- Objetivo general**

Utilizar la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) para la visualización de partículas virales unidas a células de distintos órganos de Trucha Arcoíris.

### **1.4.2.- Objetivos específicos**

Poner a punto una técnica de adsorción de virus a cortes de tejido realizado por congelación.

Describir un método para el estudio del virus IPN, in situ, en los distintos tejidos del pez, a través de IFI.

Observar la relación entre la macroscopía y la microscopía de los órganos de los alevines de Trucha Arcoíris, mediante disección y tinción con rutina Hematoxilina-eosina y tricrómico de Van Gieson.

Comparar, cualitativamente, la unión del virus IPN a los diferentes tejidos del pez estudiado, mediante detección por inmunofluorescencia indirecta.

Determinar la localización del marcaje con inmunofluorescencia, si lo hubiera.

### **1.4.3.- Alcances**

La solución consiste en la incubación de cortes realizados por congelación de tejido sano de alevines de trucha arcoíris, con virus IPN, cuya detección se realizará mediante Inmunofluorescencia Indirecta. Esto comprende la aplicación de la técnica de IFI, tanto en tejido incubado como no incubado, con propósito de contar con controles negativos. Estos resultados serán fotografiados y posteriormente comparados.

Se relaciona además, macro y microscópicamente, la anatomía de los peces, para lo cual se realizará la disección de los alevines bajo lupa y la posterior tinción de los órganos congelados del pez (corazón, cerebro, hígado, bazo, riñón y tubo digestivo). Se utilizará tinción de rutina con Hematoxilina Eosina y tinción con tricrómico de Van Gieson para la observación de detalles estructurales de los órganos mencionados.

Este trabajo no incluye comparación con otras técnicas además de las mencionadas, ni tampoco ahondará en asuntos como la signología macroscópica del pez, ni en detalles de sus efectos citopáticos.

## **1.5.- METODOLOGÍAS Y HERRAMIENTAS UTILIZADAS**

### **1.5.1.- Metodología a utilizar**

Traslado de los peces: Uno de los factores que pueden incidir sobre la virulencia de las distintas cepas del virus es el stress al que estén sometidos los ejemplares. Es por esta razón que es de suma importancia el manejo y traslado de los peces vivos desde la piscicultura de Río Blanco. Para disminuir este riesgo se ha resuelto utilizar el protocolo de P, Kinkelin, para el traslado de los peces.

Manutención del acuario: los peces fueron dispuestos en un acuario de 50 L., equipado con un sistema de oxigenación del agua y con filtro de carbón para liberar el agua de partículas nocivas para los peces, como el cloro, donde permanecieron a 17° C a pH 6 y alimentados dos veces por día con un formulario comercial durante todo el proceso de muestreo (Cifuentes, F, 1997)

Disección de los peces: se realizó bajo lupa Leica MZ6 para una mayor precisión. Incluye conservación de los órganos de algunos ejemplares post mortem en nitrógeno líquido para facilitar la inmunofluorescencia posterior, rotulación adecuada para evitar errores y para mantener controlado en todo momento los resultados que se irán dando. Incluye también la disposición de los órganos para técnica de rutina en frascos con

Formaldehído al 10%, los cuales conservaron los órganos hasta el momento de ser procesados.

Técnica de rutina con Hematoxilina – Eosina y tricrómico de Van Gieson: el procesamiento para ambas técnicas se realizó en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Gustavo Fricke, Una vez obtenidos los cortes, y luego de su paso por la estufa, éstos se dispusieron en canastillos metálicos y siguieron el protocolo clásico allí utilizado para tinción con H-E y Van Gieson, luego de lo cual se procedió a su montaje con medio de montaje Entellan.

Cortes por congelación y su infección: se trasladaron los órganos previamente congelados en nitrógeno líquido en cooler adecuadamente acondicionado para ello. Se realizaron cortes de 5 micrones de espesor. Se realizaron cuatro cortes por portaobjetos y tres portaobjetos por órgano a estudiar. Los órganos a estudiar son: corazón, hígado, bazo, ciegos pilóricos/páncreas y riñón. Los cortes se mantuvieron refrigerados hasta su incubación con virus IPN.

Técnica de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI): Se utilizó para este propósito el anticuerpo monoclonal Am 1, el cuál esta dirigido específicamente contra un epítipo de la proteína estructural de la cápside del virus, denominada VP3. Se utilizó además un segundo anticuerpo conjugado a FITC (isotiocianato de fluoresceína) que permitió su detección mediante microscopía de fluorescencia usando los filtros de excitación y emisión adecuados.

Observación y registro de resultados obtenidos: Las placas tratadas con técnica histológica de rutina fueron observadas con microscopio de campo claro, y registradas posteriormente en fotografías digitales. Las placas obtenidas mediante inmunofluorescencia indirecta, fueron observadas en microscopio de fluorescencia perteneciente al Laboratorio de Bioquímica y Virología de la Universidad de Valparaíso y posteriormente registradas también mediante fotografía digital.

### **1.5.2.- Herramientas de desarrollo**

Para el desarrollo de este trabajo se utilizaron los siguientes elementos de hardware y software:

#### Hardware

- Crióstato Leica CM1100
- Micrótopo Leica RM2125RT
- Centro de inclusión leica EG1150H
- Autotécnico Thermo Shandon CITADEL2000
- Platina de enfriamiento Thermo Shandon
- Microscopio óptico común Olympus BX-60
- Microscopio de fluorescencia Olympus BX-60
- Lupa Leica MZ6
- Computador Compaq MV540
- Cámara digital HP photosmart E317

#### Software:

- Windows XP con Microsoft Office
- Programa de trabajo de microscopía de fluorescencia
- Software de trabajo HP Image Zone

### **1.5.3 Ambiente de desarrollo**

Los peces fueron adquiridos y trasladados desde la Piscicultura de Río Blanco, Los Andes.

El proyecto se realizó principalmente en el Laboratorio Bioquímica y Virología de la Universidad de Valparaíso, donde se cuenta con un acuario debidamente acondicionado para la aclimatación y manutención de los peces, la cantidad necesaria de virus IPN a utilizar y todo lo necesario para la conservación post mortem de los peces y los materiales requeridos para efectuar la técnica de inmunofluorescencia indirecta.

Los cortes por congelación se efectuaron en el Crióstato perteneciente al Laboratorio de Histopatología de Centromed.

Las tinciones de los cortes, así como el procesamiento, inclusión y cortes en micrótomo, se realizaron en el servicio de Anatomía Patológica del Hospital Gustavo Fricke.

En cuanto al recurso humano además del apoyo del profesor guía TM M Cs. Juan Carlos Espinoza, se contó con la colaboración de otros profesionales de la salud.

Se utilizaron dependencias, equipos, instrumental y algunos recursos del servicio de Anatomía Patológica, del Hospital Gustavo Fricke, así como del servicio de Histopatología del centro médico “Centromed”, ambos bajo el mando del Médico Patólogo Dr. Raúl González, quién ha dado su autorización para ello. Se ha contado también con la colaboración de la TM Sra. María Soledad Mandiola, quién ha supervisado y asistido en forma técnica los cortes en crióstato.

Para una mejor caracterización de las placas obtenidas con técnica de rutina (H-E y VG) se contó con la colaboración del Dr. David Cabrera C., Médico Patólogo del servicio de Anatomía Patológica del Hospital Gustavo Fricke, Viña del Mar.

## **1.6.- RESULTADOS OBTENIDOS**

El objetivo general fue resuelto con éxito. Se visualizaron partículas virales mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta, en los distintos órganos estudiados, lo que se demuestra en las fotos presentadas en el punto 2.4.- exposición de resultados.

La fluorescencia observada corresponde, efectivamente, a partículas virales, dado su tamaño, el uso de controles y la experiencia que se ha obtenido durante años en el Laboratorio de Bioquímica y Virología de la Universidad de Valparaíso, en el estudio del virus IPN.

En cuanto a los objetivos específicos, fue posible la puesta a punto de la técnica de adsorción de virus IPN a los cortes de tejido, lo que permitió visualizar las partículas virales mediante microscopía de fluorescencia.

También se realizó la descripción de un método de IFI para el estudio del virus en cortes de tejido realizados por congelación, se estandarizó una técnica que se detalla en el punto 2.24.- Metodología de los cortes por congelación, infección y detección por Inmunofluorescencia Indirecta.

La disección de los alevines se realizó bajo lupa en el laboratorio de Bioquímica y Virología de la Universidad de Valparaíso. Durante este procedimiento fue posible separar, retirar y caracterizar cada uno de los órganos del pez, los cuales fueron debidamente fotografiados y se presentan también en el punto 2.4.- exposición de resultados.

Los órganos, previamente separados, fueron fijados en formaldehído al 10% y derivados al Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Gustavo Fricke donde fueron procesados de tal manera de obtener dos placas con cada órgano, una teñida con Hematoxilina – Eosina y otra con tricrómico de Van Gieson. Luego de la observación con microscopio de campo claro se tomaron las fotografías respectivas, dentro de las cuales se presentan las más representativas por órgano. Las placas fueron observadas por el Médico Patólogo Dr. David Cabrera Caviedes, quién otorgó las caracterizaciones de las respectivas placas.

Se advirtieron diferencias en la cantidad de partículas virales presentes por órgano, lo que hizo posible cumplir con el objetivo de comparar cualitativamente la unión del virus a los distintos órganos estudiados

El marcaje con inmunofluorescencia que indica la presencia de las partículas virales se observa claramente asociada a las células de los tejidos en estudio. Lo que resuelve la inquietud de localización de las partículas virales, avalando su adsorción.

Se cumplió con cada uno de los objetivos con un alto grado de satisfacción, observable mas adelante en los puntos: 2.2.- Descripción de los métodos utilizados y 2.4.- exposición de resultados.

## **CAPÍTULO 2-. DESARROLLO DEL TEMA**

## **2.1.-FUNDAMENTOS TEÓRICOS Y ESTADO DEL ARTE DEL DOMINIO DEL PROBLEMA**

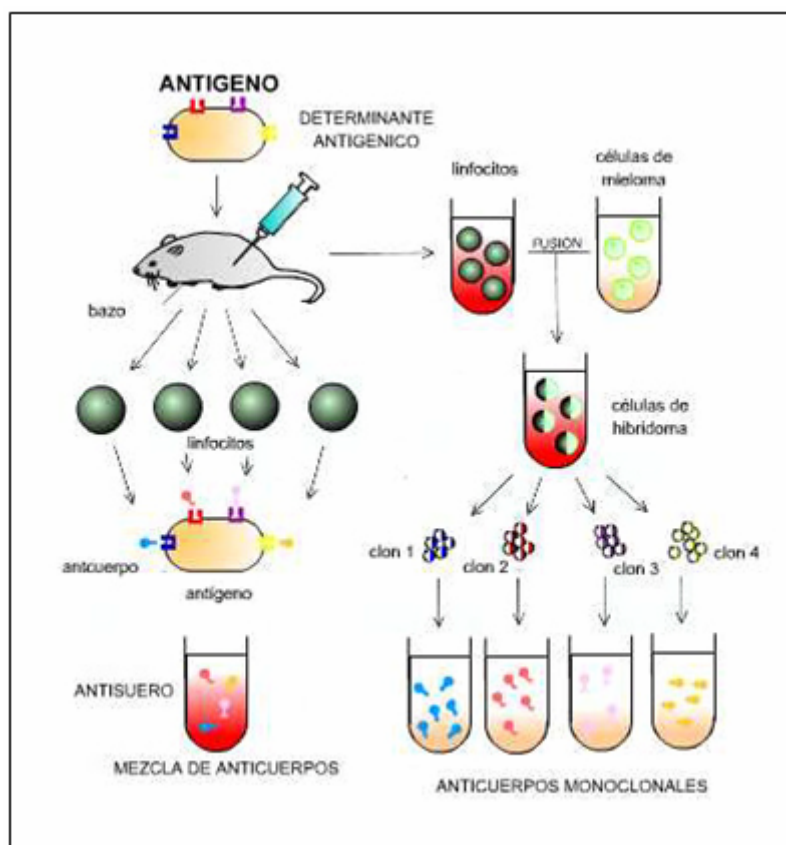
### **2.1.1.- Fundamentos teóricos:**

El fundamento de la elección de la técnica radica principalmente en las ventajas de la inmunofluorescencia indirecta como método diagnóstico. Se sabe que la sensibilidad obtenida por IFI es mayor a la obtenida mediante el uso de inmunofluorescencia directa (IFD), esto pues el anticuerpo secundario, conjugado al fluoróforo, puede unirse a más de una molécula de anticuerpo primario, dando como resultado una amplificación mucho mayor de la señal fluorescente en relación a la misma cantidad de antígenos virales.

Por otro lado se determinó el uso de un anticuerpo monoclonal lo que nos asegura una especificidad mucho mayor.

En el año 1975, Köhler y Milstein desarrollaron una técnica que permitiría el crecimiento de poblaciones clonales de células, secretando anticuerpos con una especificidad definida. Esto consistió en fusionar células, específicamente linfocitos B, provenientes del bazo de animales expuestos al antígeno, con células de mieloma, un tipo de tumor de linfocitos B, formando de este modo lo que se conoce como un hibridoma, células fusionadas híbridas que pueden crecer rápida e indefinidamente por ser de origen tumoral. De este modo se obtuvieron gran cantidad de anticuerpos específicos, conocidos como anticuerpos monoclonales.

Estos anticuerpos, fabricados por los hibridomas, son todos iguales ya que proceden de un único linfocito de partida, fundamento en el que radica su especificidad. Estos hibridomas pueden crecer tanto *in vitro* como *in vivo*.



*Figura 2.1.-* Esquematización de la producción de anticuerpos monoclonales donde se detallan los pasos en la producción del hibridoma.

Por último, cabe destacar, que tanto la decisión de utilizar Inmunofluorescencia Indirecta, como el uso de anticuerpos monoclonales, se encuentran avaladas por el Laboratorio de Bioquímica y Virología de la Universidad de Valparaíso, tras años de estandarizar la técnica en estudios asociados a virus IPN.

### **2.1.2.-Estado del Arte:**

El virus IPN fue por primera vez descrito en 1941 en truchas arcoíris que exhibían un extraño comportamiento, giraban sobre sus ejes, y presentaban una alta mortalidad (McGonigle, 1941). Su naturaleza infecciosa fue dilucidada en 1960, donde se demostró su transmisión, a través del agua, a ejemplares de trucha arcoíris saludables (Sniezko et al., 1960). Su naturaleza viral, fue reportada también en 1960, luego de la inyección de filtrados libres de bacterias a truchas susceptibles, y en la infección de cultivos celulares de tejidos de estos mismos. Posteriormente cuando peces susceptibles

eran inoculados con los fluidos de los cultivos celulares, los signos del Virus IPN solían producirse. (Wolf et al., 1960)

La última recopilación bibliográfica con los datos obtenidos de las distintas investigaciones del virus fue realizada en el año 2003, si bien entrega bastante información, hace notar, también, que aún hay grandes temas que no han sido cubiertos y sobre los cuales aún existe una nebulosa, entre ellos la claridad sobre las distintas cepas del virus, sus formas de transmisión y otros asuntos relacionados con el actuar del virus en el pez. (Rodríguez Saint-Jean, et. als, 2003)

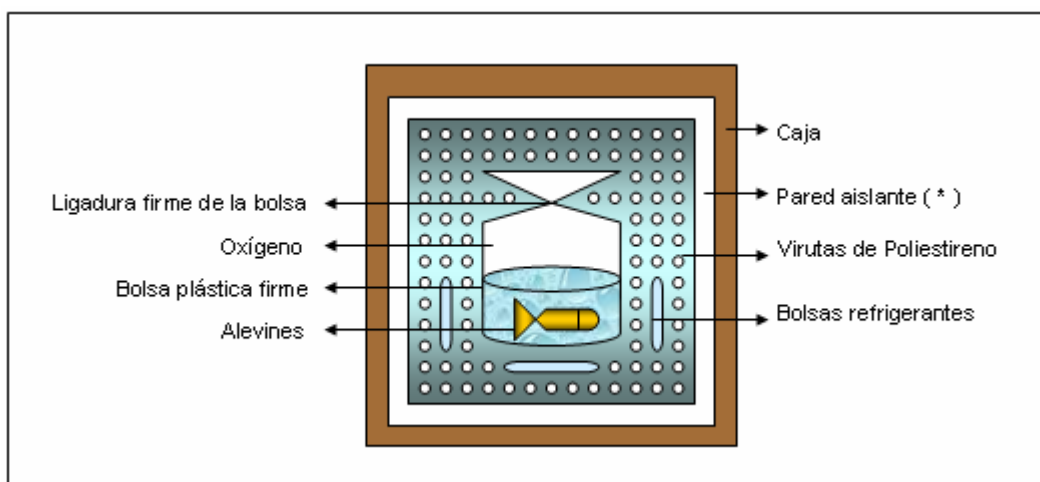
## **2.2.-DESCRIPCIÓN DE LOS MÉTODOS UTILIZADOS**

### **2.2.1.- Metodología del traslado y manutención de los peces:**

Los alevines, de entre 8 y 12 centímetros, fueron traídos desde la piscicultura de Río Blanco, Los Andes, mediante el protocolo de P, Kinkelin para el traslado de los peces, el cual consiste en lo siguiente:

- Disponer los peces en una bolsa de plástico que contenga agua con gran cantidad de oxígeno.
- La cantidad de agua necesaria debe ser tal, que una vez cerrada la bolsa y apoyada esta en el suelo, para favorecer la mezcla de gases con el agua, los peces estén totalmente cubiertos. Las bolsas irán firmemente atadas con cuerdas o ligaduras.
- Disponer las bolsas en cajas llenas de virutas de poliestireno, o bien papel picado, esto como medida antigolpes y como aislante para evitar cambios bruscos de temperatura.

- Si fuera necesario, colocar un paquete de hielo dentro de la caja con el fin de mantener la temperatura a un nivel adecuado, esto pues, mientras menos suba la temperatura por encima de su valor original, mayor supervivencia se dará entre los peces.
- Como regla general se colocan hasta cinco alevines, por cada litro de agua (D. A. Conroy y G, Armas, 1981)

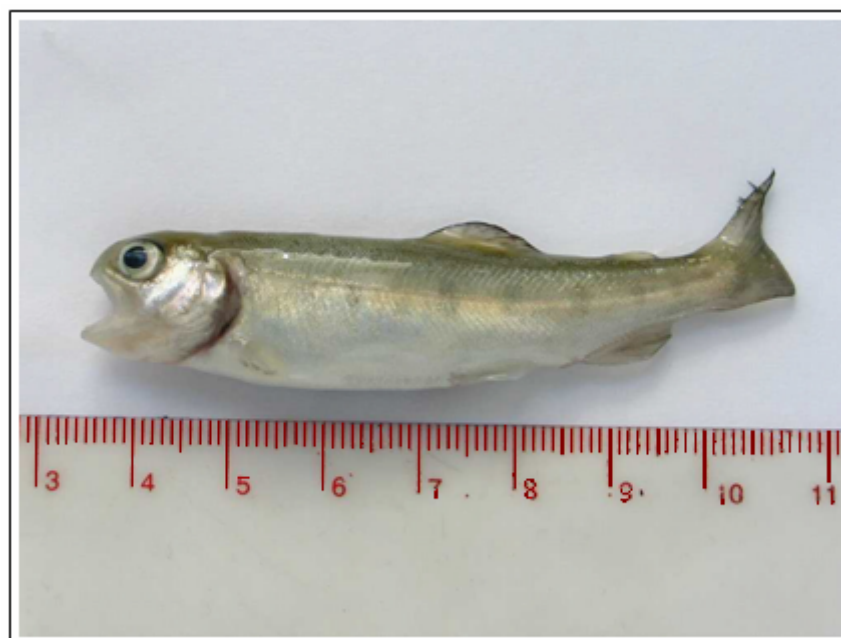


*Figura 2.2.- Esquemización de la forma de traslado de los alevines descrita por P. Kinkelin en el “Tratado de enfermedades de los peces”. El ( \* ) corresponde a pared aislante para lo cual pueden utilizarse planchas de poliestireno.*



*Figura 2.3.- traslado de los peces*

a) Fotografía Piscicultura Río Blanco, Los Andes. b) Fotografía que retrata el lugar donde se mantienen los alevines de trucha arcoíris en la piscicultura. c) Fotografía que muestra el conteo de los alevines ya separados para el traslado. d) alevines ya separados.



*Figura 2.4.- tamaño promedio de los alevines*

Se suscitaron dos problemas con respecto al traslado y manejo de los peces:

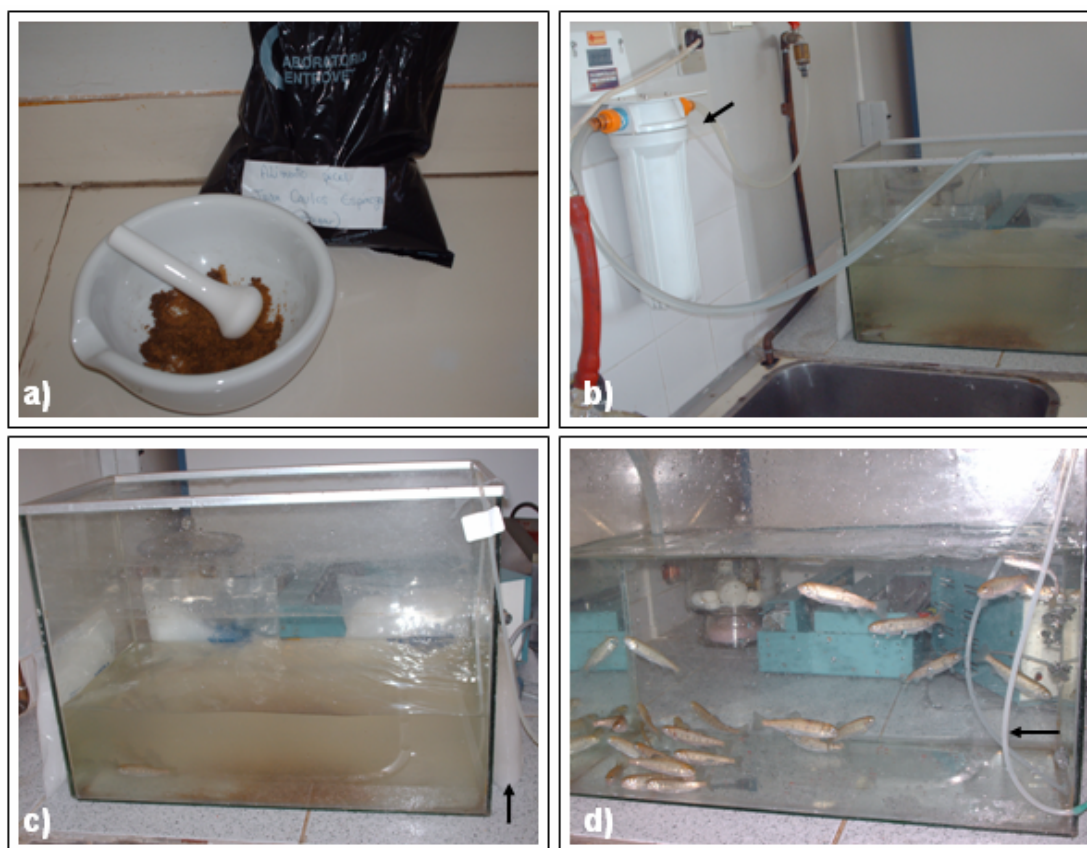
Los peces no fueron trasladados según el protocolo propuesto: El protocolo no fue seguido. La recomendación era que los peces fueran dispuestos de manera tal que, hubiera un máximo de 10 peces por bolsa, considerando que el protocolo propone que haya un máximo de 5 alevines por litro de agua y que las bolsas alcanzaban un volumen de 3 litros de agua, esta petición fue desatendida. Como resultado, los 50 alevines fueron dispuestos en una sola bolsa, muriendo alrededor de 30 de ellos durante al viaje y en horas posteriores a este. Dejando, como consecuencia, a los sobrevivientes en un evidente estado de stress.

Los peces sufrieron problemas de adaptación al nuevo ambiente: Se presume que el stress provocado por el viaje, sumado al cambio de alimentación, incrementaron este estado en los sobrevivientes. El resultado fue la muerte de todos los peces dentro de la semana post traslado.

Una vez terminado el traslado, los peces fueron depositados en acuario de 50 L con filtro de carbón y tubo de oxígeno, dispuesto para este fin en el laboratorio de Bioquímica y Virología de la Universidad, donde permanecieron los siguientes días en proceso de aclimatación.

Para la manutención de los peces, fueron alimentados dos veces al día con un formulario comercial que fue previamente molido para facilitar su deglución, el acuario se mantuvo rodeado de bolsas refrigerantes para mantener el agua a una temperatura adecuada. Cada día se cambió cuidadosamente la mitad del agua del acuario, para mantener a los peces con agua fresca, el agua pasaba previamente por un filtro de carbón que la liberaba del cloro y otras partículas, dejándola lista para ser utilizada en el acuario. Además de esto el acuario estaba provisto de una manguera que proporcionaba oxígeno de manera constante a los peces.

Dada la muerte de los peces, los alevines que habían sido seleccionados como controles fueron utilizados para la resolución de esta investigación.



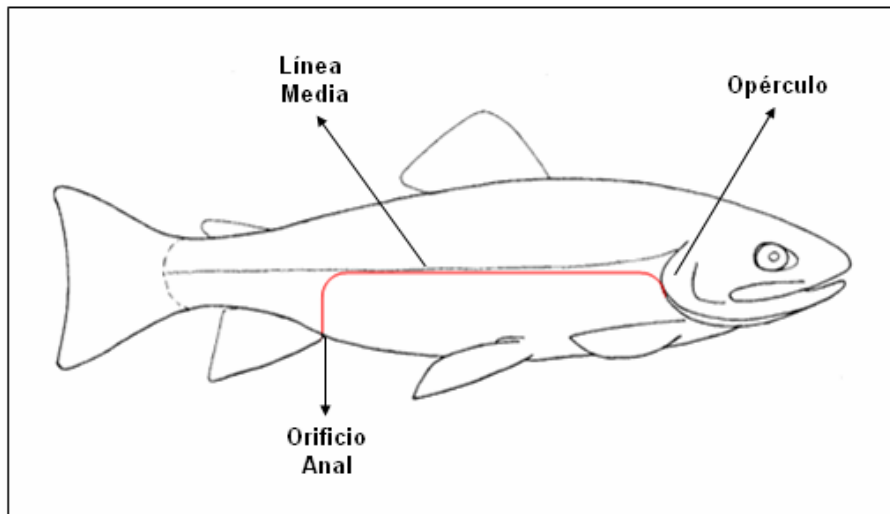
*Figura 2.5.- Fotografías relacionadas con la manutención del acuario.*

a) muestra el alimento utilizado para la alimentación de los peces y como este fue previamente molido para ser utilizado. b) se observa el proceso de manutención, la flecha muestra el filtro de carbón. c) otra fotografía del proceso de manutención diario del acuario, la flecha muestra las bolsas refrigerantes utilizadas para mantener la temperatura del acuario. d) fotografía del acuario con el agua ya cambiada, la flecha muestra el tubo de oxígeno que mantenía oxigenada el agua.

### **2.2.2.- Metodología del estudio exploratorio del pez:**

La disección se hizo bajo lupa Leica MZ6, con instrumental de microcirugía para un mejor dominio de las estructuras a observar. El pez fue abierto mediante el procedimiento clásico de estudio exploratorio de peces, este procedimiento consiste en realizar un corte vertical con tijera, desde el orificio anal hasta la línea media del pez y desde allí extender la incisión hasta el opérculo. Luego de esto se separa piel y músculo hacia un lado y dejar al descubierto los órganos y vísceras, los cuales fueron fotografiados. Para el retiro del cerebro de los peces, se realizaron varias incisiones con

tijera de microcirugía en la parte alta de la cabeza del pez, hasta dejarlo expuesto. El retiro se realizó con sumo cuidado dada la labilidad del órgano en cuestión.



*Figura 2.6.-* ejemplificación de la metodología utilizada para la disección de los alevines, conforme con el procedimiento clásico de estudios exploratorios de peces.

Se separaron órganos y vísceras y fueron dispuestos en frascos correctamente rotulados, con formaldehído al 10% para su fijación y debida conservación para los procedimientos posteriores. Para esta parte de la investigación se utilizaron dos alevines de trucha arcoíris. Los órganos aislados fueron: cerebro, corazón, riñón, hígado, bazo y tubo digestivo, de los cuales se separaron estómago, ciegos pilóricos e intestino.



*Figura 2.7.- disección de los alevines.*

Fotografía donde se observa la microdissección de los alevines bajo lupa Leica MZ6, en el laboratorio de Bioquímica y Virología de la Universidad de Valparaíso. En el recuadro inferior izquierdo se observa detalle de la visión bajo lupa.

### **2.2.3.- Metodología de las técnicas para el estudio histológico:**

Los órganos previamente fijados en frascos correctamente rotulados, fueron dispuestos en gasa y cassettes histológicos de orificio pequeño, dado su tamaño. Los cassettes fueron posteriormente dejados en autotécnico donde quedaron procesándose. Los pasos detallados definidos para este autotécnico son los siguientes:

- Formaldehído 10% durante 3 horas
- Alcohol 96° durante 45 minutos
- Alcohol 96° durante 45 minutos
- Alcohol 96° durante 1 hora
- Alcohol absoluto 1 hora
- Alcohol absoluto 1 hora
- Alcohol absoluto 1 hora
- Xilol 46 minutos

- Xilol 1 hora
- Xilol 1 hora 30 minutos
- Parafina 1 hora
- Parafina 1 hora 50 minutos

Los órganos ya infiltrados en parafina fueron incluidos en centro de inclusión y se realizaron los cortes en micrótomo, previo enfriamiento en platina de frío dispuesta para ello. Se sacaron cortes para dos portaobjetos con cada órgano, realizando cortes lo más representativos posibles, los cortes se hicieron de 5 micrones de espesor, salvo los cortes de cerebro que se hicieron de 8 micrones de espesor por las características del tejido. Los cortes fueron adheridos a sus portaobjetos con albúmina.

Una vez finalizados los cortes, los cuales fueron dispuestos en dos canastillos metálicos distintos, para las dos tinciones posteriores, estos se dejaron en estufa a 60°C durante 20 minutos.

Se realizaron tanto tinción de rutina con hematoxilina-eosina como con método tricrómico de Van Gieson, para dar realce a las fibras colágenas, las cuales se apreciarán muy bien en estructuras tales como estómago y ciegos pilóricos. Posteriormente se dio paso al montaje de las placas con medio de montaje Entellán. Las tinciones se realizaron con los protocolos de trabajo utilizados en el servicio de Anatomía patológica del hospital Gustavo Fricke, detallados a continuación:

#### **2.2.3.1.-Protocolo de tinción con Hematoxilina – Eosina:**

- Xilol 5 minutos
- Xilol 5 minutos
- Xilol 10 minutos
- Alcohol 96° 12 dipping
- Alcohol 96° 12 dipping
- Alcohol 96° 12 dipping
- Agua corriente 10 minutos

- Hematoxilina de Harris 10 minutos
- Agua corriente para viraje
- Dipping en alcohol ácido 1%
- Agua corriente 10 minutos
- Limpieza de placas para mejor calidad de la técnica
- Eosina alcohólica 1% durante 3 minutos
- Alcohol absoluto 12 dipping
- Alcohol absoluto 12 dipping
- Alcohol absoluto 12 dipping
- Alcohol absoluto – Xilol 1:1, 12 dipping
- Xilol 12 dipping
- Xilol 12 dipping

#### **2.2.3.2.-Protocolo de tinción con tricrómico de Van Gieson modificado:**

- Xilol 5 minutos
- Xilol 5 minutos
- Xilol 10 minutos
- Alcohol 96° 12 dipping
- Alcohol 96° 12 dipping
- Alcohol 96° 12 dipping
- Agua corriente 10 minutos
- Hematoxilina de férrica de Weigert 10 minutos
- Agua corriente 10 minutos
- Limpieza de placas para mejorar calidad de la técnica
- Picroponceau 12 dipping
- Alcohol absoluto 12 dipping
- Alcohol absoluto 12 dipping
- Alcohol absoluto 12 dipping
- Alcohol absoluto – Xilol, 1:1, 12 dipping
- Xilol 12 dipping x 2



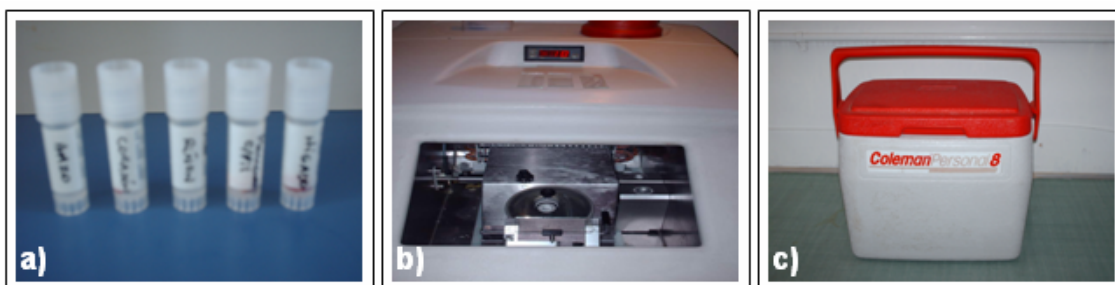
*Figura 2.8.- Fotografías del procesamiento de rutina de las muestras.*

a) frascos rotulados con formaldehído al 10% donde fueron dispuestos los órganos. b) cassettes histológicos debidamente rotulados conteniendo los distintos órganos envueltos en gasa. c) Centro de inclusión y pinza temperada donde se realizaron los moldes para ser posteriormente cortados. d) tacos listos luego de la inclusión, correctamente rotulados, con los órganos orientados de tal manera que favorezcan su posterior corte en micrótopo. e) realización de los cortes en micrótopo donde puede observarse la cinta de corte. f) cortes ya realizados en sus respectivos portaobjetos correctamente rotulados dispuestos en canastillos para su paso por la estufa. g) tinción de ambos canastillos tanto con Hematoxilina-Eosina como con tricrómico de Van Gieson, reloj utilizado para este procedimiento. h) Montaje de las placas con Entellán. i) Placas ya terminadas, listas para su observación en microscopio de campo claro.

#### **2.2.4.- Metodología de los cortes por congelación, infección y detección por Inmunofluorescencia indirecta:**

Luego de la disección de los peces, los órganos aislados fueron dispuestos en tubos pequeños, correctamente rotulados, especiales para su congelación en nitrógeno líquido. Luego de su congelación fueron mantenidos en refrigeración a  $-70^{\circ}\text{C}$  en refrigerador del laboratorio de Bioquímica y Virología de la Universidad de Valparaíso, hasta el momento de su traslado para realizar los cortes.

Los tubos fueron trasladados en cooler debidamente acondicionados. Los cortes se realizaron en crióstato Leica CM1100 a  $-18 / -20^{\circ} \text{C}$ .

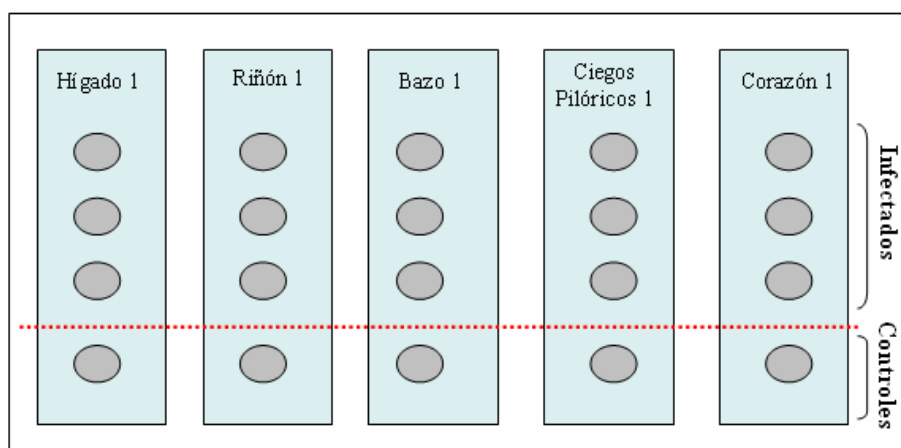


*Figura 2.9.- Fotografías del procesamiento de los órganos para IFI.*

a) órganos en tubos para congelación en nitrógeno líquido. b) realización de cortes en crióstato a  $-20^{\circ} \text{C}$ . c) cooler debidamente acondicionado para el traslado y refrigeración de órganos y cortes.

Se realizaron cortes de cinco órganos del pez: riñón, bazo, hígado, ciegos pilóricos y corazón. Se hicieron cortes de 5 micrones de espesor, los cuales fueron dispuestos de a cuatro por portaobjetos. Se dispuso de tres portaobjetos por órgano. Los cortes ya realizados permanecieron refrigerados hasta el momento de ser utilizados.

Para la incubación con el virus IPN, se dispuso un portaobjetos con cada órgano, de los cuatro cortes dispuestos en cada portaobjetos sólo los tres superiores fueron infectados con el virus, dejando el corte inferior como control negativo. La infección se realizó incubando el virus con un título viral de  $1 \cdot 10^8 / \text{ml}$  durante una hora y media a temperatura ambiente.



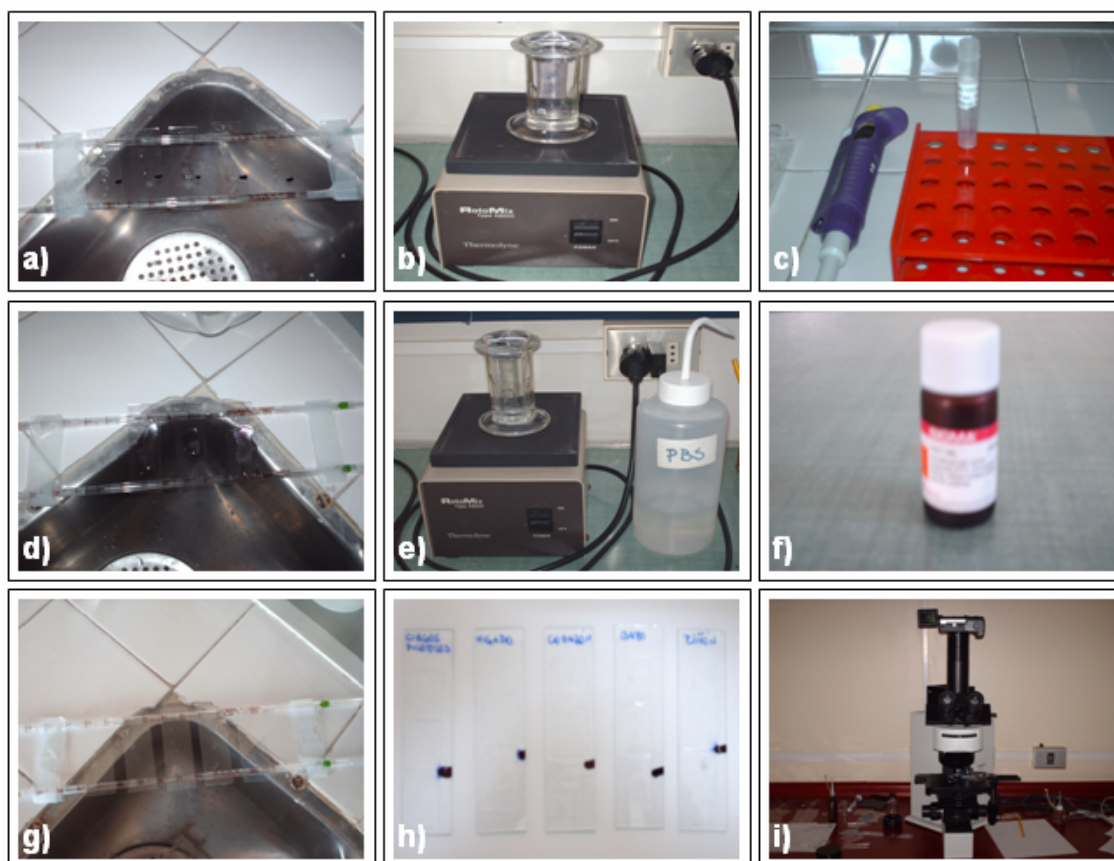
*Figura 2.10.- Dibujo esquemático de la metodología utilizada para la incubación con virus IPN de los portaobjetos con los cortes realizados por congelación. El virus se incubó durante una hora y media a temperatura ambiente.*

Luego de la incubación se realizaron tres lavados con PBS, se fijaron los cortes con metanol durante 10 minutos y se volvió a lavar tres veces con PBS.

Posteriormente se incubó el anticuerpo primario AM1, dirigido contra la proteína estructural VP3 de la cápside del virus IPN. Se incubaron con el anticuerpo por igual tanto cortes incubados como controles no incubados con virus. La incubación con el anticuerpo primario tuvo una duración de 45 minutos, luego de la cual se realizaron nuevamente 3 lavados con PBS.

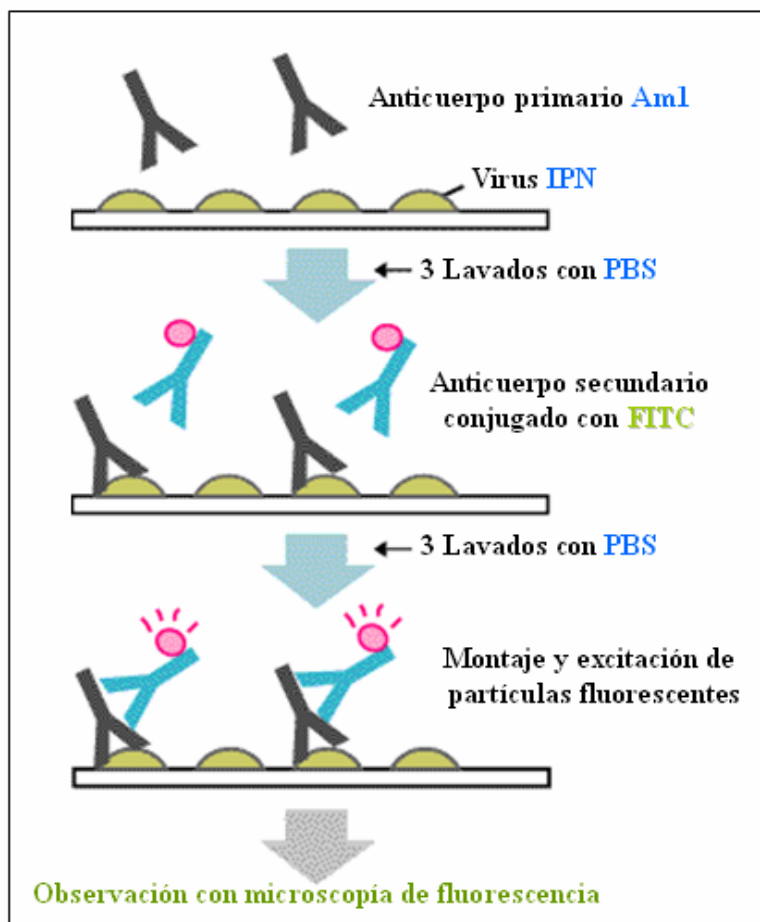
Por último se incubó con anticuerpo secundario IgG anti ratón conjugado con FITC (isotiocianato de fluoresceína) para su visualización mediante microscopía de fluorescencia. Esta incubación también tuvo una duración de 45 minutos. Posteriormente a esto, los cortes fueron nuevamente lavados tres veces con PBS y se montó con medio de montaje (Dako) para microscopía de fluorescencia.

Finalmente se realizó la observación por microscopía de fluorescencia y el registro fotográfico de los resultados.



*Figura 2.11.- Fotografías del proceso de infección e IFI*

a) Infección de los cortes superiores con virus IPN. Cortes inferiores fueron infectados, quedando como controles negativos. b) Lavados sucesivos con PBS. c) Anticuerpo primario Am 1 utilizado. d) incubación del anticuerpo 1° durante 45 minutos a temperatura ambiente para todos los cortes. e) tres lavados sucesivos con PBS. f) anticuerpo secundario utilizado anti – ratón conjugado a FITC. g) incubación anticuerpo 2° durante 45 minutos a temperatura ambiente para todos los cortes. h) placas listas para la observación, desde la marca hacia abajo se encuentran los controles negativos. i) Observación de los cortes y registro fotográfico de los resultados.



*Figura 2.12.-* Esquematación de la metodología utilizada para la detección por inmunofluorescencia. Ambos anticuerpos fueron incubados durante 45 minutos a temperatura ambiente.

## 2.3.-DESARROLLO DE LA SOLUCIÓN

### 2.3.1.- Análisis de la solución:

La solución fue diseñada partiendo de la base de que, si es posible la observación de partículas virales y sus productos en cultivos celulares, bien podría hacerse un ensayo de adsorción de partículas virales a células de cortes de tejidos previamente infectados con el virus IPN.

### 2.3.2.- Diseño, construcción y pruebas:

Se decidió la utilización de inmunofluorescencia indirecta (IFI) dado que se conoce que esta entrega una mayor sensibilidad que la inmunofluorescencia directa (IFD), puesto que en IFI el segundo anticuerpo, conjugado con FITC, tiene la posibilidad de unirse a más de una molécula de anticuerpo primario, amplificando de esta forma, la señal fluorescente en relación a la misma cantidad de antígenos virales.

Para la realización de esta investigación, y dada la naturaleza de la técnica elegida para ello, se hizo necesaria la utilización de controles que permitieran determinar que no se produjera ningún tipo de unión inespecífica de los anticuerpos a las células de los tejidos en estudio.

Para ello, en primer lugar se determinó el uso de un anticuerpo monoclonal, Am1, cuya característica principal es la especificidad con la que actúa por reconocer, de manera específica, la proteína estructural VP3 de la cápside del virus IPN. Por otra parte, este anticuerpo ha sido ampliamente utilizado en investigación de virus IPN desde hace años en el laboratorio de Virología y Bioquímica de la Universidad de Valparaíso, lo que avala su calidad, dada la experiencia obtenida en la práctica.

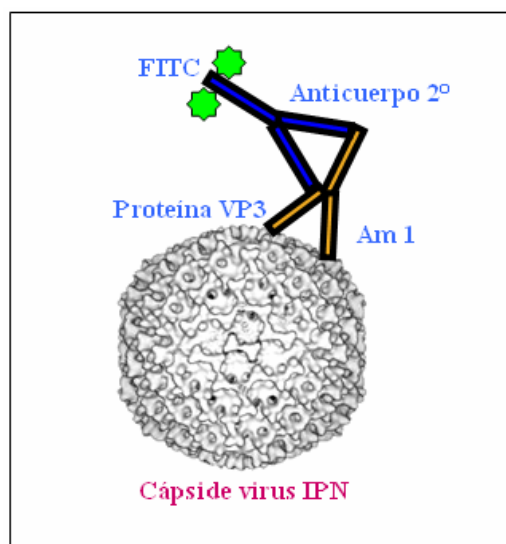


Figura 2.13.-Representación de la relación virus IPN – anticuerpos en IFI.

En segundo lugar se determinó el uso de controles negativos, de tal manera de avalar que no existiera ningún tipo de unión inespecífica de los anticuerpos. Para ello de los cuatro cortes existentes por portaobjeto de cada uno de los órganos a estudiar, sólo tres de ellos fueron infectados. Posteriormente todos fueron sometidos al diagnóstico por Inmunofluorescencia indirecta. Esperándose que, de existir fluorescencia en los cortes infectados, esta no apareciera en los controles negativos.

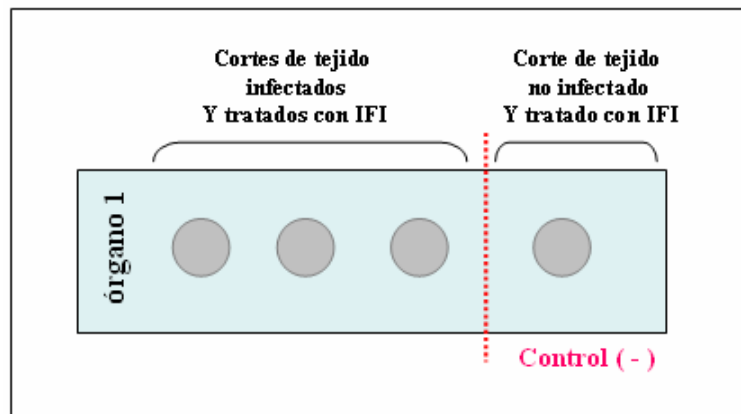


Figura 2.14.- Esquematización utilización de controles negativos para la técnica IFI.

## 2.4.-EXPOSICIÓN DE RESULTADOS

### 2.4.1.- Resultados de la disección de los alevines y su examinación macroscópica:

Mediante la disección de los alevines fue posible reconocer, separar y retirar los distintos órganos, para sus estudios posteriores.

La disección fue realizada bajo lupa Leica MZ6 y con instrumental de microcirugía, con lo cual se logró un mejor manejo de las estructuras observadas, esto debido al pequeño tamaño de los alevines.

A continuación se presenta un paralelo entre el dibujo esquemático de la anatomía interna de la trucha arcoíris y lo observado en la disección de los alevines en el laboratorio.

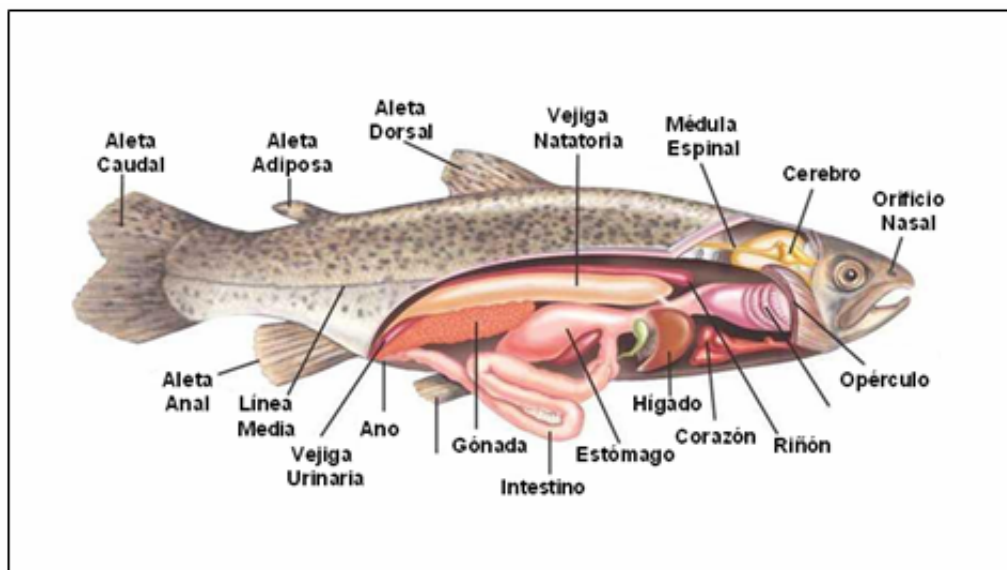
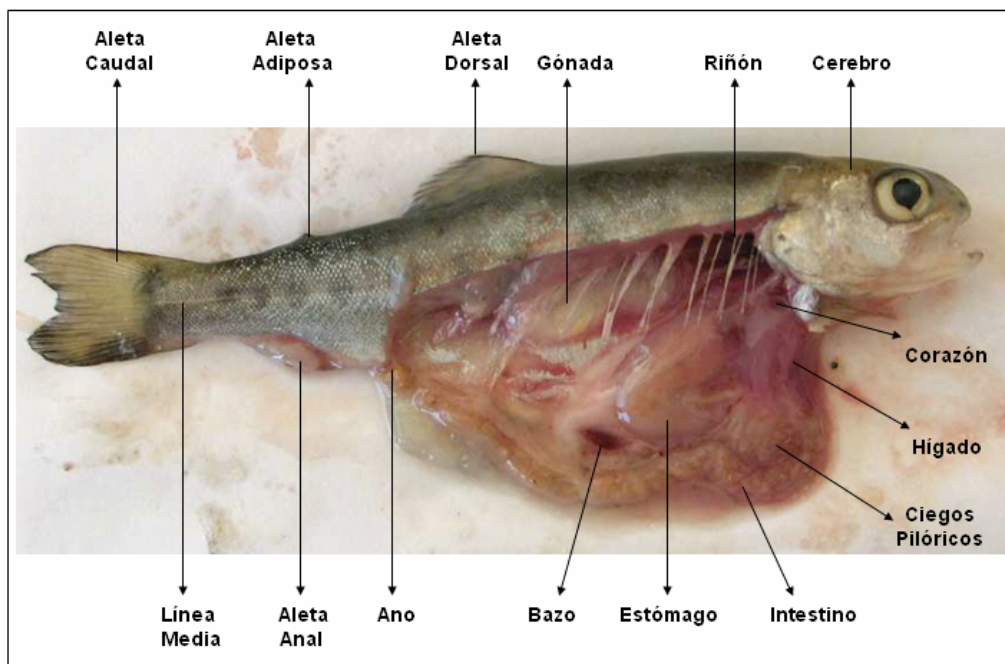


Figura 2.15.- Esquematización de la anatomía interna en *Onchorinchus mykiss*



*Figura 2.16.-* Resultado de la disección, caracterización de los órganos.

En la fotografía no se observa la vejiga natatoria, puesto que fue necesario retirarla para dejar expuesto el riñón. De todos modos la vejiga natatoria se observa como un órgano tubular que tiene la capacidad de llenarse de aire para la flotación de los peces.

En la fotografía puede observarse además el estómago, dispuesto en forma de U como es típico, los ciegos pilóricos, como un conjunto de prolongaciones intestinales sin fondo y cabe destacar también el pequeño tamaño del corazón, con respecto al resto de los órganos observados.

#### **2.4.2.-Resultados de la examinación histológica de rutina:**

Los peces utilizados para estos fines murieron por asfixia, razón por la cual los órganos presentan algunos rasgos típicos de este tipo de muerte. A continuación se presenta una descripción de las placas histológicas de los distintos órganos que fueron estudiados.

Bazo: Parénquima se encuentra conservado, presenta hemorragia difusa sugerente de anoxia.

Corazón: Tejido miocárdico vascularizado y presencia de infiltrado inflamatorio linfocitario difuso.

Hígado: parénquima hepático con trabéculas que recuerdan estructura hepática infantil. Se observa infiltrado inflamatorio linfocitario difuso.

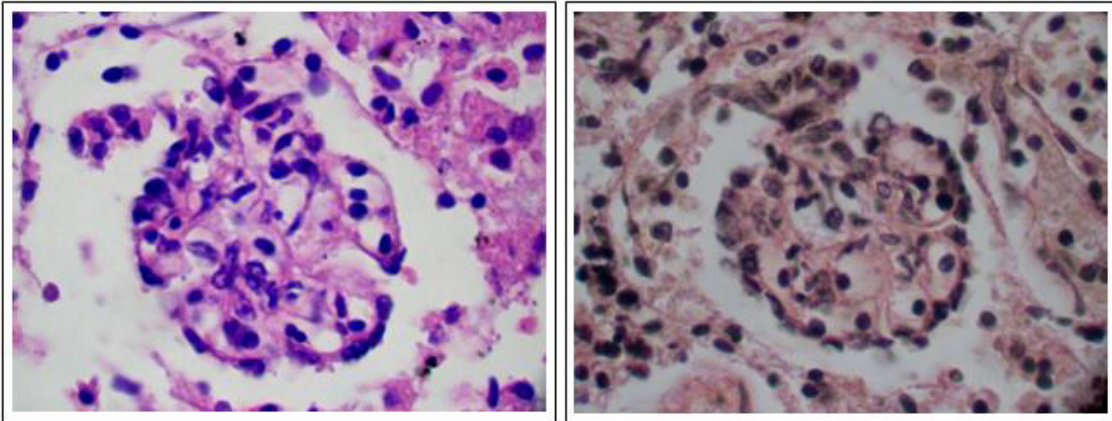
Riñón: parénquima renal con glomérulos reconocibles. Se observan túbulos con epitelio conservado. Infiltrado inflamatorio difuso linfocitario.

Estómago y ciegos pilóricos: presentan infiltrado inflamatorio linfocitario difuso. Algunos lúmenes ocupados con células de aspecto vegetal, se presume que por motivo de la alimentación.

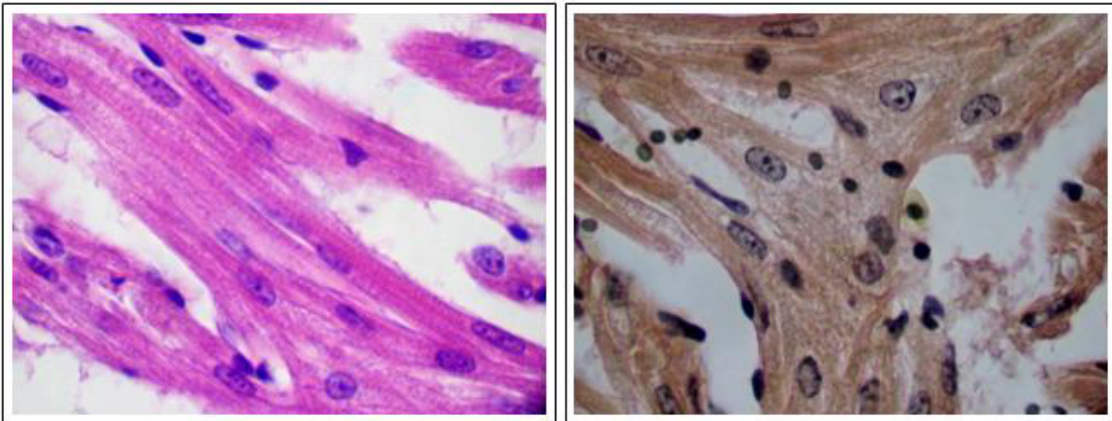
Cerebro: de aspecto conservado. Se observan núcleos neuronales.

Tanto el infiltrado inflamatorio linfocitario, como la hemorragia difusa del bazo sugerente de anoxia, forman parte de los signos típicos esperables de la muerte por asfixia. En general los tejidos presentan aspecto normal.

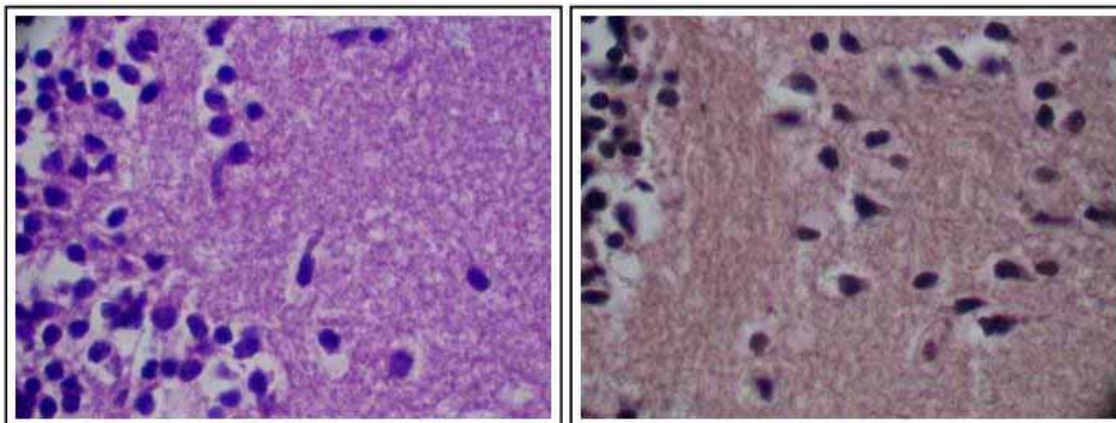
Los cortes realizados fueron observados bajo microscopio de campo claro, fotografiándose aquellas imágenes más representativas por órgano. Se fotografiaron imágenes con ambas técnicas utilizadas, hematoxilina-eosina y tricrómico de Van Gieson. Enfrentándose las fotografías para una mejor comprensión.



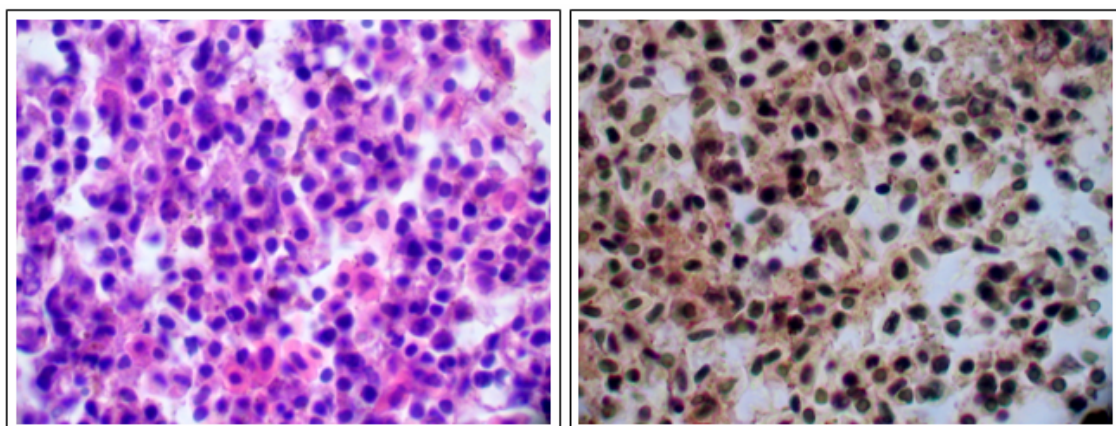
*Figura 2.17.-* Fotografías de los cortes de riñón de los peces en estudio. A la Izquierda: glomérulo renal teñido con Hematoxilina – Eosina. A la derecha: glomérulo renal teñido con tricrómico de Van gieson. en ambos infiltrado inflamatorio linfocitario difuso. Observación con microscopio de campo claro, aumento 400 x.



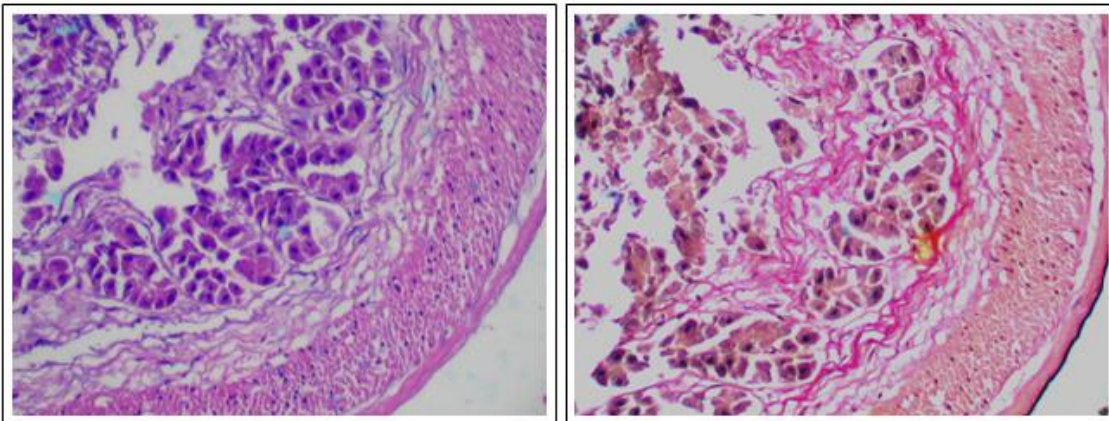
*Figura 2.18.-* Fotografías de los cortes de corazón de los peces en estudio. A la izquierda: células musculares cardiacas teñidas con Hematoxilina – Eosina. A la derecha: células musculares cardiacas teñidas con técnica de Van Gieson. En ambas son observables nucleolos producto de cierto grado de reacción inflamatoria relacionada con la muerte de los peces. Observación en microscopio de campo claro, aumento 400x.



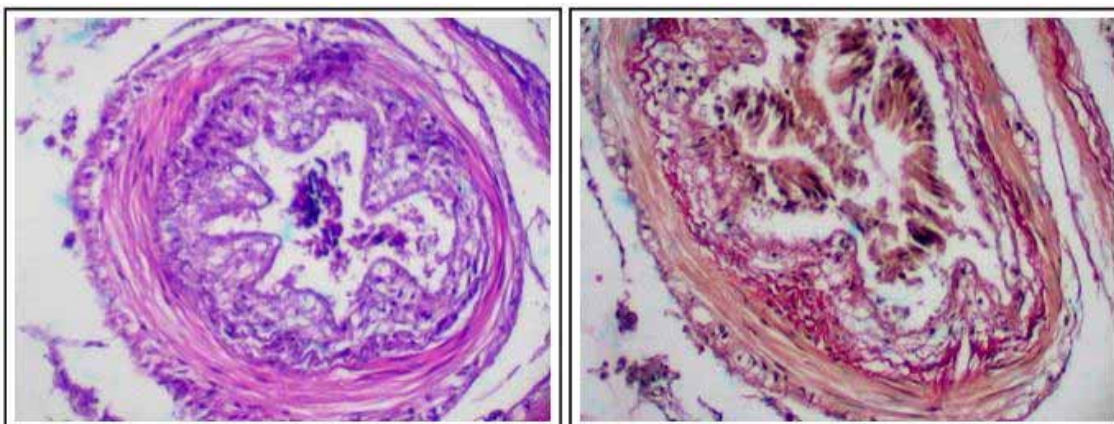
*Figura 2.19.-* Fotografías de los cortes de cerebro de los peces en estudio. A la izquierda: corteza y médula cerebral teñido con Hematoxilina – Eosina, se observan los núcleos neuronales en la corteza cerebral. A la derecha: corteza y médula cerebral teñido con técnica de Van Gieson, se observan los núcleos neuronales en negro agrupados en la corteza cerebral. Observación y fotografías tomadas en microscopio de campo claro, aumento 400x.



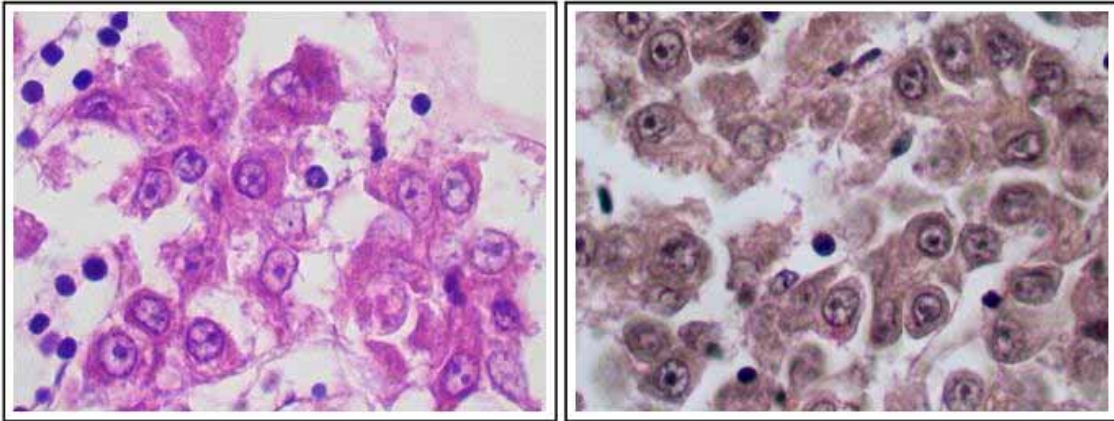
*Figura 2.20.-* Fotografías de los cortes de bazo de los peces en estudio. A la Izquierda con Hematoxilina – Eosina, se observa cierto grado de hemorragia difusa relacionada con la muerte de los peces. A la derecha con tricrómico de Van Gieson. Observación y fotografías tomadas en microscopio de campo claro, aumento 400x.



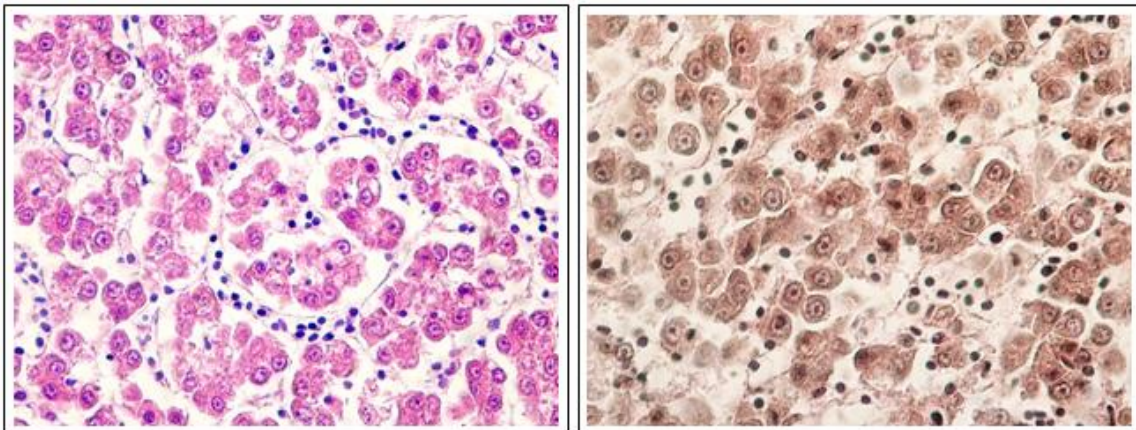
*Figura 2.21.-*Fotografías de los cortes de estómago de los peces en estudio. A la izquierda: teñido con Hematoxilina – Eosina. A la derecha: teñido con técnica de Van Gieson. En su lumen fue posible observar restos alimenticios Observación en microscopio de campo claro, aumento 400x.



*Figura 2.22.-* Fotografías de los cortes de ciegos Pilóricos de los peces en estudio. A la izquierda: teñido con Hematoxilina – Eosina. A la derecha: teñido con técnica de Van Gieson. En su lumen pueden observarse células de origen vegetal, producto de la alimentación de los peces. Observación en microscopio de campo claro, aumento 400x.



*Figura 2.23.-* Fotografías de los cortes de Hígado de los peces en estudio. A la izquierda: teñido con Hematoxilina – Eosina. A la derecha con técnica de Van Gieson. Se observa infiltrado linfocitario difuso. Observación en microscopio de campo claro, aumento 400x.

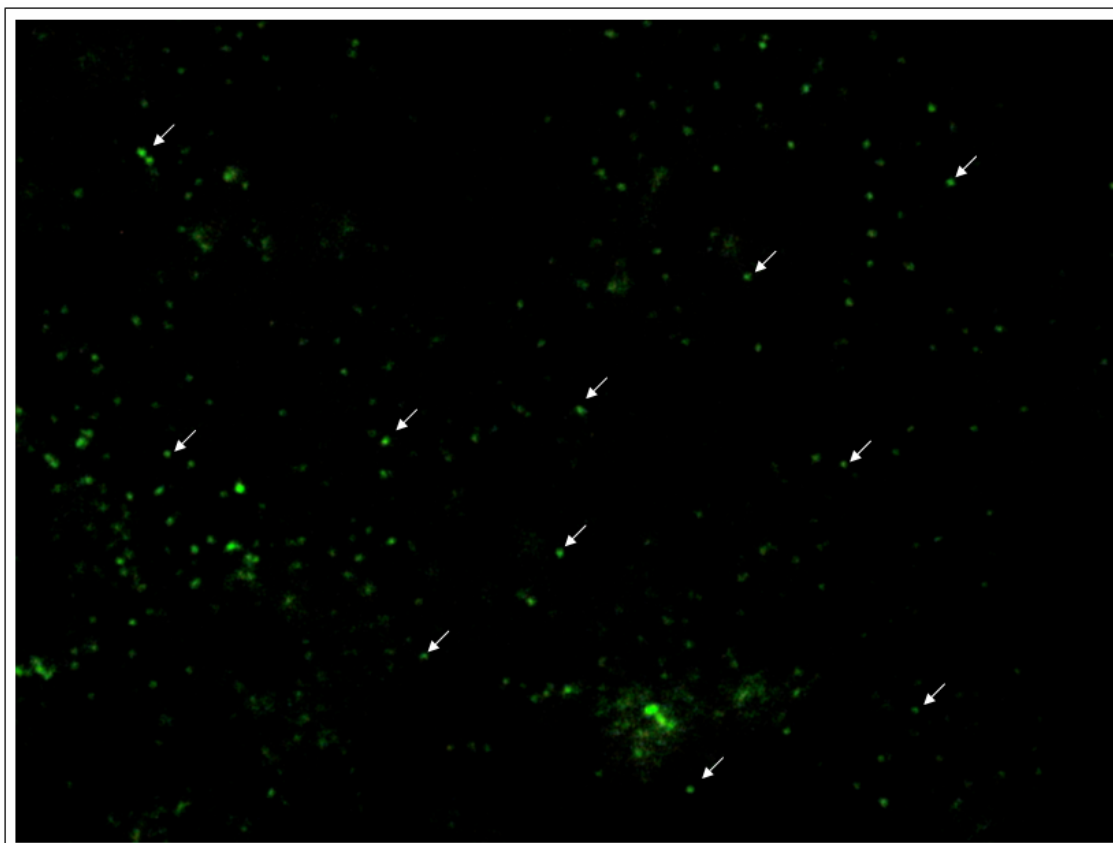


*Figura 2.24.-* Fotografías de los cortes de Hígado de los peces en estudio. A la izquierda: teñido con Hematoxilina – Eosina, aquí puede apreciarse la disposición trabecular del parénquima hepático. A la derecha con técnica de Van Gieson. Observación en microscopio de campo claro, aumento 100x.

### 2.4.3.- Resultados de la infección y técnica de Inmunofluorescencia indirecta:

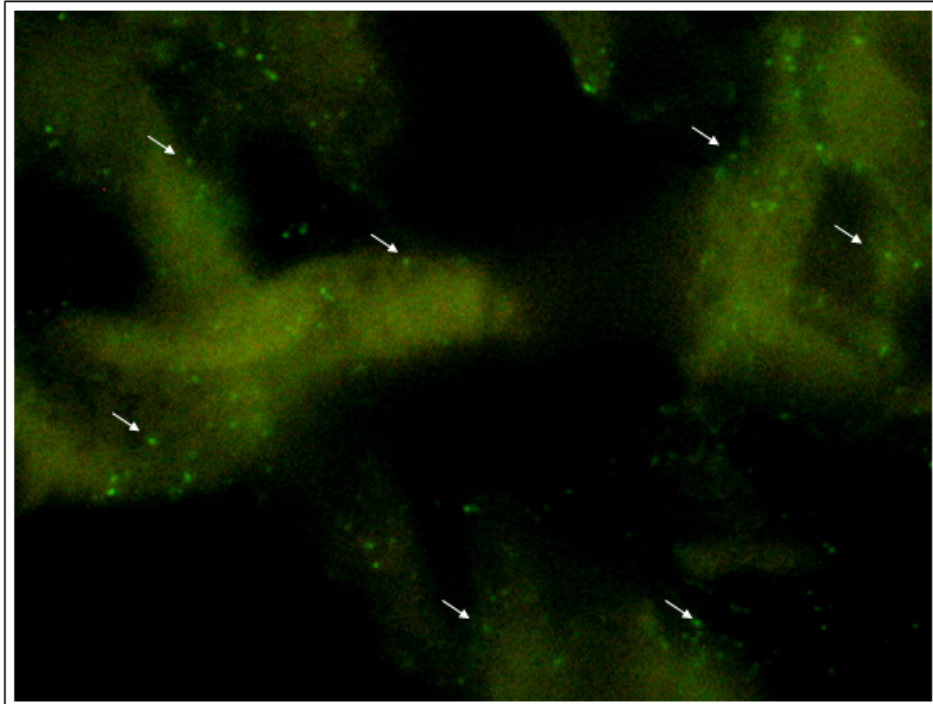
Luego de realizada la técnica de inmunofluorescencia indirecta, al ser observadas las placas mediante microscopía de fluorescencia, se hace evidente la presencia de partículas virales en aquellas placas que han sido incubadas con el virus.

La predilección del virus por los distintos órganos fue notablemente distinta, registrándose una predilección mucho mayor por órganos tales como bazo, hígado y corazón, contra ciegos pilóricos y riñón.

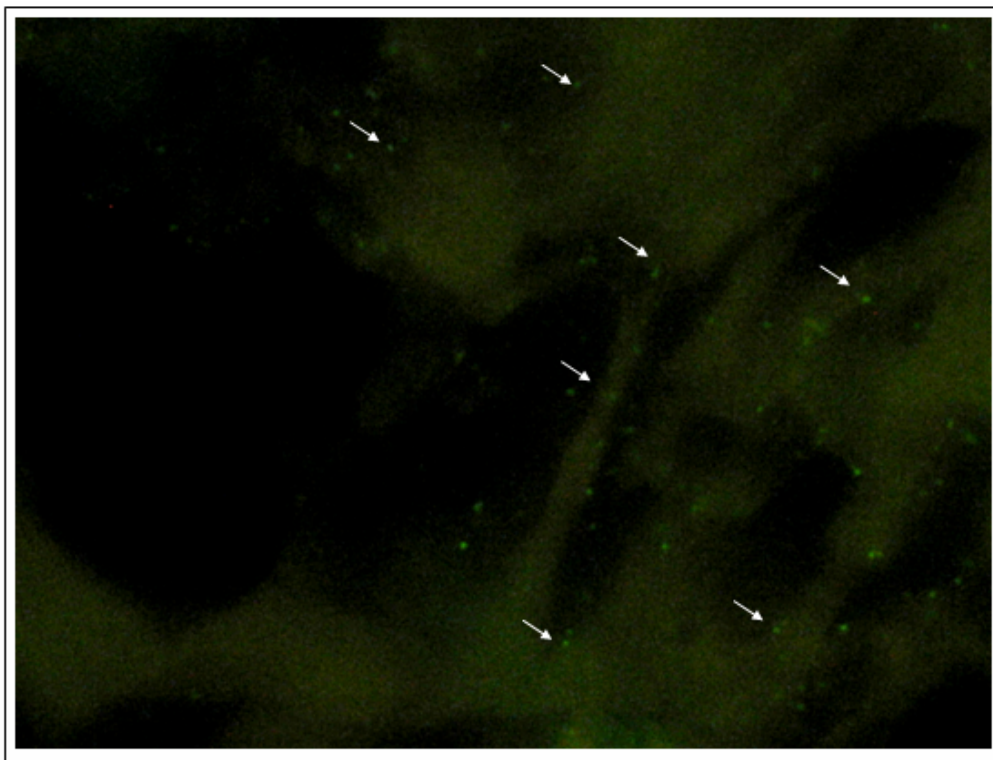


*Figura 2.25.- Localización de partículas virales con IFI. Las flechas indican partículas virales.*

Con respecto a la localización de las partículas virales observadas, no fue necesario realizar otro tipo de técnica para avalar la adsorción del virus, puesto que se puede observar a simple vista que las partículas virales se encuentran asociadas a las siluetas de las células de los tejidos en estudio.



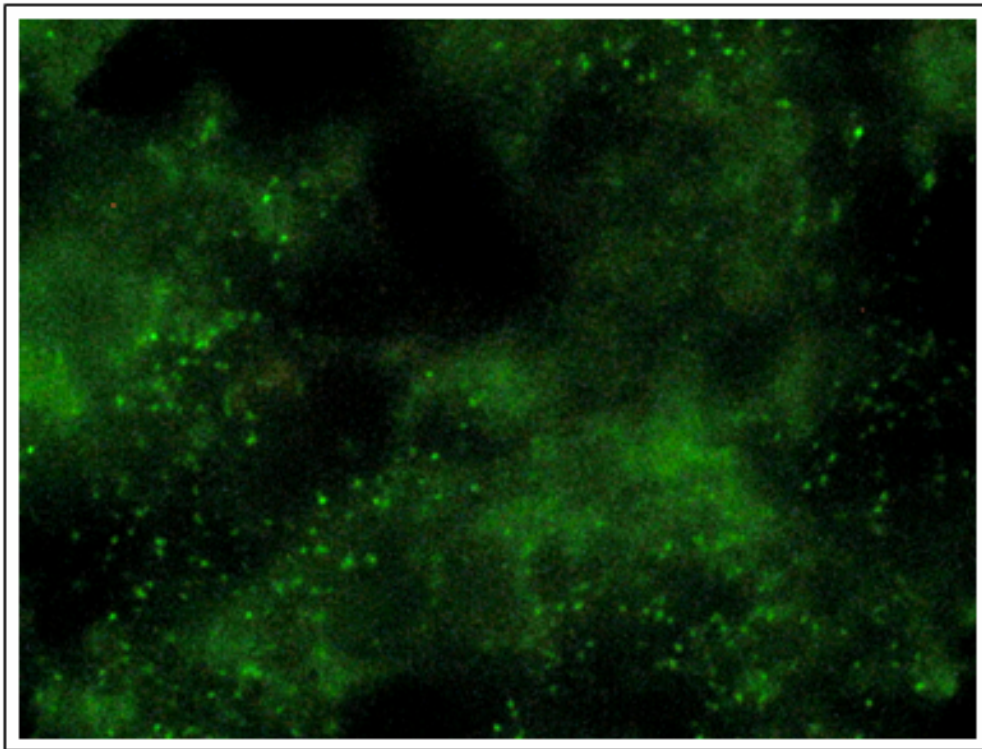
2.26.- *Localización de partículas virales I.* En la fotografía se observan partículas virales asociadas a células musculares de un corte de corazón.



2.27.- *Localización de partículas virales II.* En la fotografía nuevamente se observan partículas virales asociadas a células musculares, algunas dispuestas longitudinalmente. Aquí se aprecian con mayor claridad los contornos celulares. Corte de corazón.

A continuación se presentarán las fotografías más representativas tomadas de los cortes de tejido incubados con virus IPN, como de sus controles negativos y tratados con técnica de inmunofluorescencia indirecta.

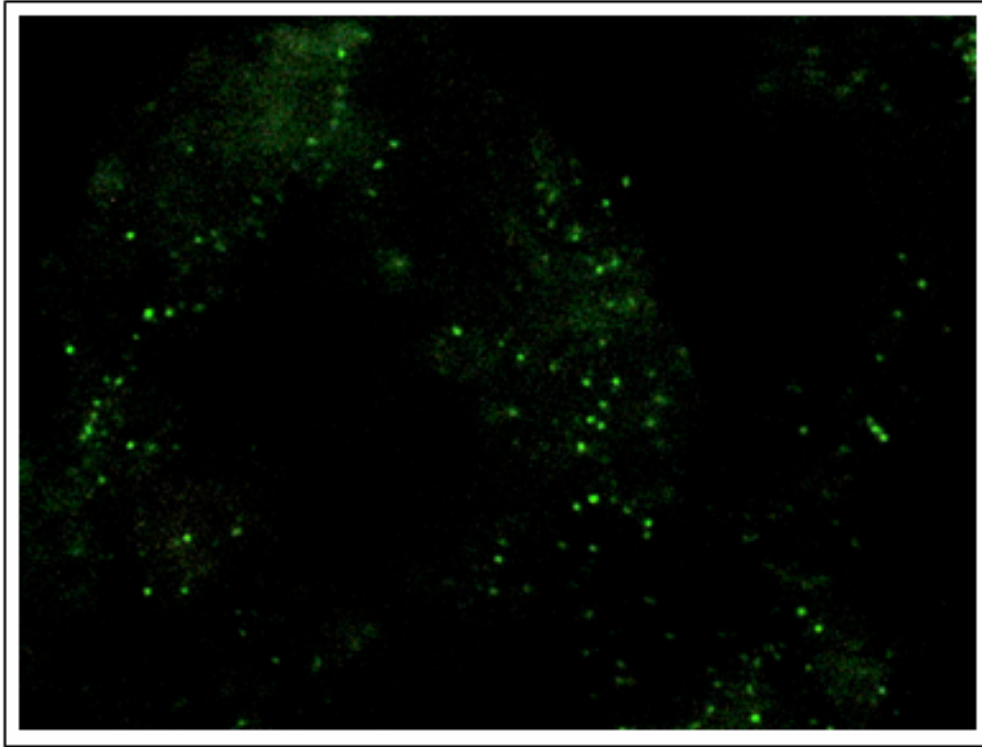
Las fotografías de cada órgano serán presentadas enfrentando aquellas de cortes infectados con el virus IPN, contra sus controles negativos en cada página.



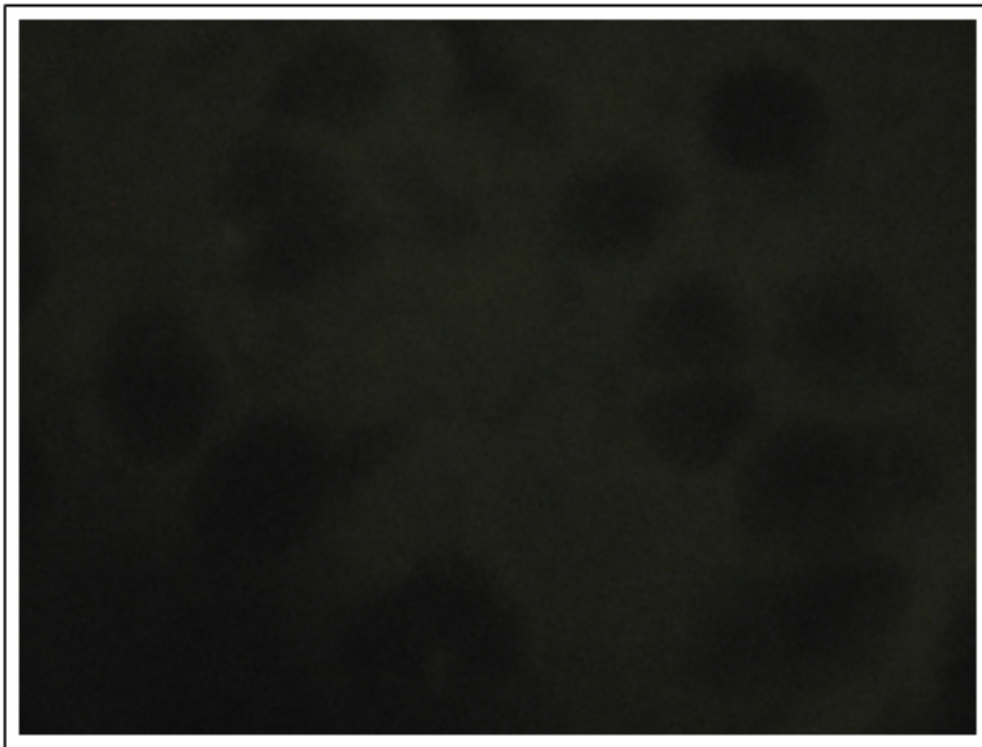
*Figura 2.28.-* observación bajo microscopía de fluorescencia de corte de tejido de bazo incubado con virus IPN. Detección de partículas virales mediante IFI.



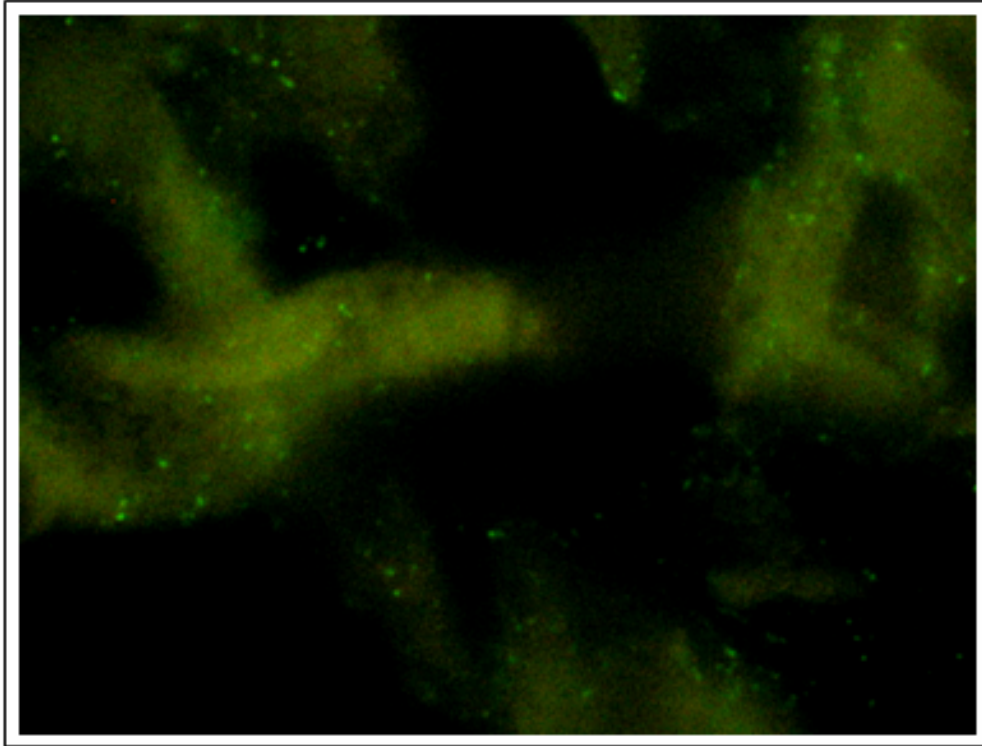
*Figura 2.29.-* Observación bajo microscopía de fluorescencia de corte de tejido de bazo no incubado con virus IPN (control negativo) la muestra no mostró partículas fluorescentes a pesar de la técnica de IFI aplicada.



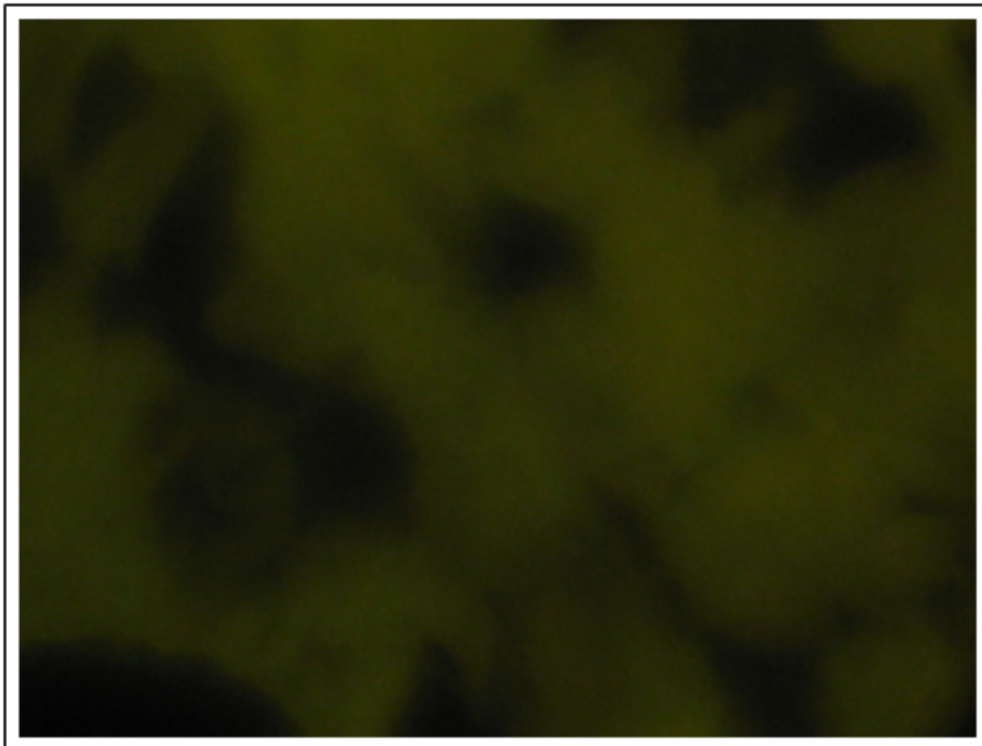
*Figura 2.30.-* Observación bajo microscopía de fluorescencia de corte de tejido de Hígado incubado con virus IPN. Detección de partículas virales mediante IFI.



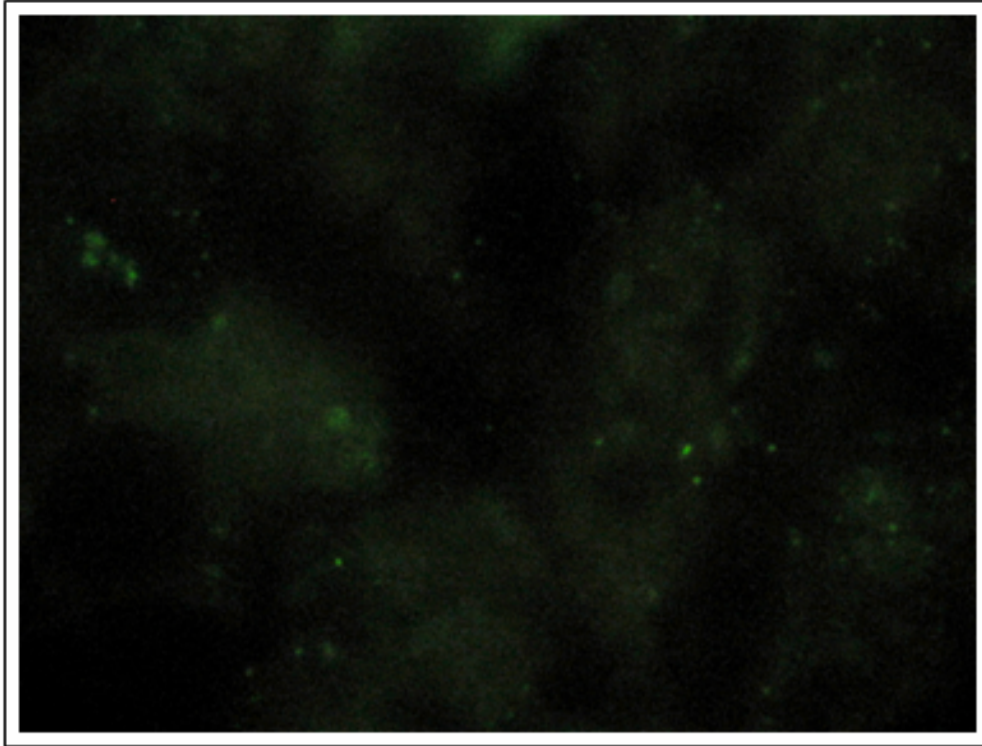
*Figura2.31.-* Observación bajo microscopía de fluorescencia de corte de tejido de Hígado no incubado con virus IPN (control negativo) la muestra no mostró partículas fluorescentes a pesar de la técnica de IFI aplicada.



*Figura 2.32.-* Observación bajo microscopía de fluorescencia de corte de tejido de Corazón incubado con virus IPN. Detección de partículas virales mediante IFI.



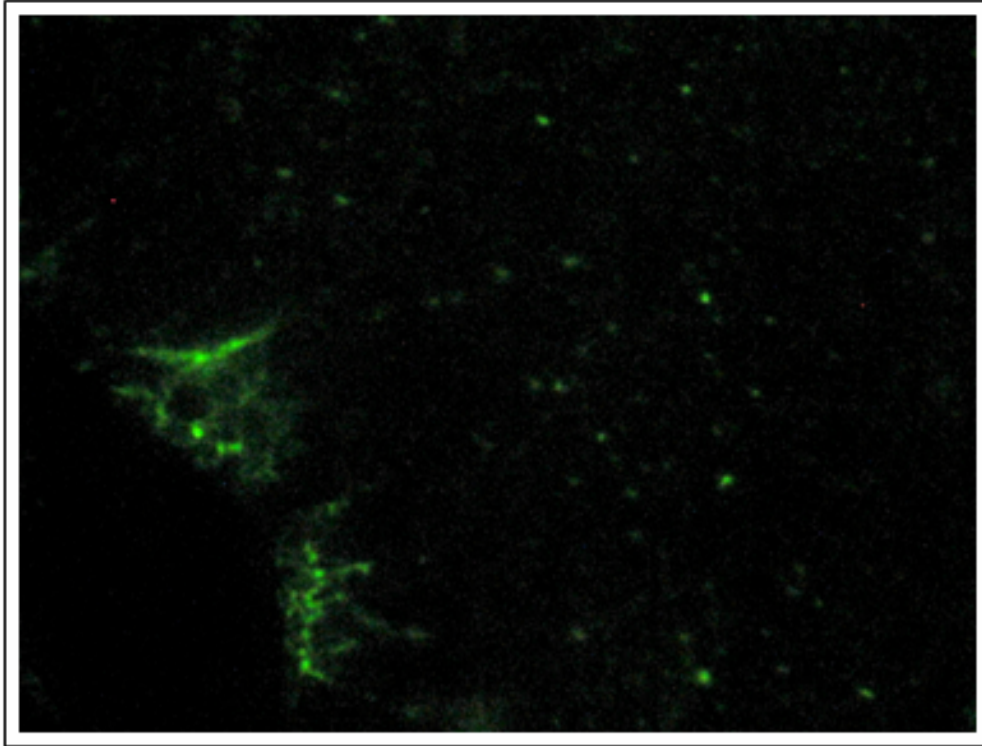
*Figura 2.33.-* Observación bajo microscopía de fluorescencia de corte de tejido de corazón no incubado con virus IPN (control negativo) la muestra no mostró partículas fluorescentes a pesar de la técnica de IFI aplicada.



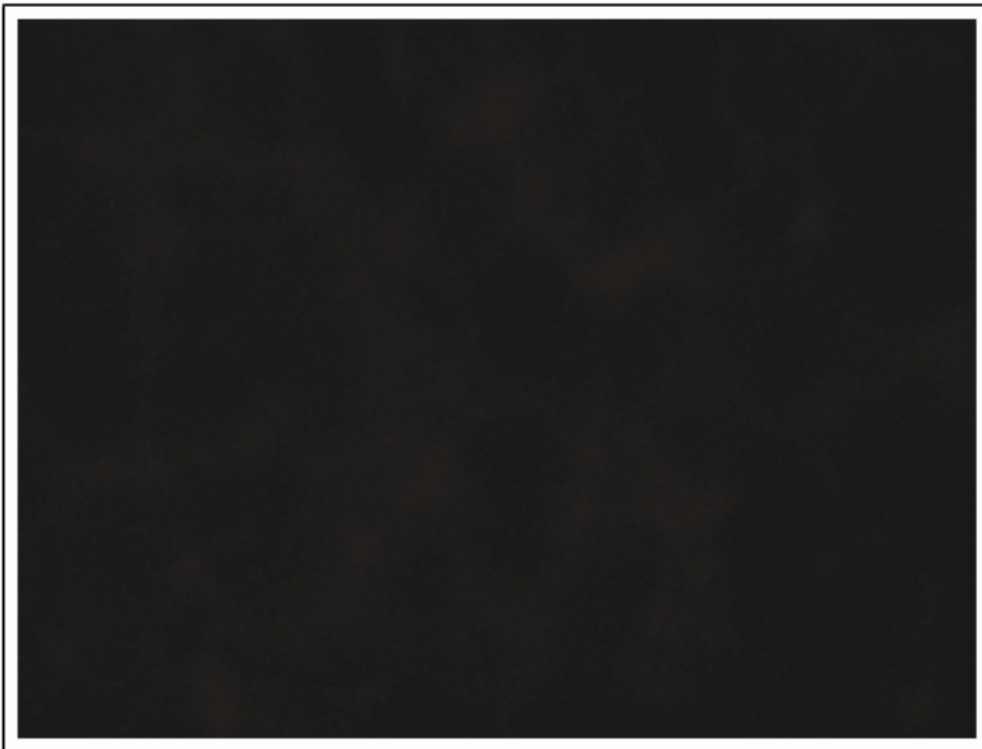
*Figura 2.34.-* Observación bajo microscopía de fluorescencia de corte de tejido de ciegos pilóricos incubados con virus IPN. Detección de partículas virales mediante IFI.



*Figura 2.35.-* Observación bajo microscopía de fluorescencia de corte de tejido de ciegos pilóricos no incubados con virus IPN (control negativo) la muestra no mostró partículas fluorescentes a pesar de la técnica de IFI aplicada.



*Figura 2.36.-* Observación bajo microscopía de fluorescencia de corte de tejido de Riñón incubados con virus IPN. Detección de partículas virales mediante IFI.



*Figura 2.37.-* Observación bajo microscopía de fluorescencia de corte de tejido de Riñón no incubados con virus IPN (control negativo) la muestra no mostró partículas fluorescentes a pesar de la técnica de IFI aplicada.

## 2.5.-DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

A partir de los resultados obtenidos podemos determinar, que el virus es capaz de ser adsorbido a células de tejidos previamente cortados por congelación, ya que se observan partículas virales asociadas a las células de los distintos tejidos.

Tal como es descrito por Beesley et. al. (1993), la técnica de inmunofluorescencia indirecta resultó ser adecuada para la identificación de partículas virales de virus IPN, cumpliendo con los requerimientos de especificidad y sensibilidad.

Es importante ratificar que los focos fluorescentes observados, corresponden efectivamente, a partículas virales y no son productos de artefactos de técnica, ni de uniones inespecíficas. Esto ha sido confirmado gracias al uso de controles negativos y dado el tamaño de los focos fluorescentes, los cuales tienen un tamaño correspondiente con el de las partículas virales observadas por esta misma técnica en cultivos celulares.

Se esperaba una mayor unión de partículas virales a las células renales, puesto que, según (Fryer, 1981) se reconoce que la porción anterior del riñón en estos peces, cumple una función hematopoyética y que el virus IPN presenta una reconocida predilección por estos órganos. Dados los resultados, se presume que al momento de separar y retirar los órganos durante la disección, no se tomó la porción anterior de este órgano. Esto debido a las dificultades que presenta la separación de un tejido lábil en alevines de baja talla, lo que complica su manipulación.

Se sugiere además que las diferencias en la unión de las partículas virales a los distintos órganos estudiados, podrían indicar una mayor cantidad de receptores específicos de membrana en estas células. Esto podría orientar en la concentración de los esfuerzos en el estudio de adsorción, entrada y amplificación del virus IPN en estas células.

Por otra parte, la información obtenida acerca de las diferencias observadas en la unión del virus entre órgano y órgano, podría ser de gran ayuda para el diseño de antivirales destinados a tratar y combatir la enfermedad.

## 2.6-. CONCLUSIONES

Se reconoce la técnica de inmunofluorescencia indirecta como una técnica adecuada para el estudio de partículas virales, de virus IPN, en tejidos infectados previamente con el virus.

Dada la sensibilidad de la técnica, en el reconocimiento de partículas virales, se le reconoce como un instrumento útil para el estudio de estados portadores del pez.

Las partículas virales son capaces de unirse a las células de tejidos previamente cortados por congelación.

Existen diferencias en cuanto a la unión de las partículas virales entre los distintos órganos del pez.

*Tabla 2.1.- Número promedio de partículas virales por campo observado.*

Órgano estudiado	Nº de partículas virales Promedio por campo	
	Incubados con virus IPN	Controles (-)
Bazo	212	0
Hígado	134	0
Corazón	98	0
Ciegos pilóricos	67	0
Riñón	44	0

De la tabla se desprende que sí existe, evidentemente, una predilección mayor del virus por ciertos tejidos sobre otros. En esta investigación destaca un número alto de partículas virales en el bazo, siendo casi el doble de las visualizadas en hígado, el órgano que le sigue en número.

Órganos como bazo, hígado y corazón presentaron una mayor cantidad de partículas virales por campo.

Órganos como ciegos pilóricos y riñón en su porción posterior presentaron una menor cantidad de partículas virales por campo.

Los cortes no infectados con el virus (controles negativos), no presentaron ningún tipo de fluorescencia. No existió unión inespecífica de los anticuerpos.

## REFERENCIAS

- 1) BEESLEY, J.E. (1993). *Multiple immunolabelling techniques. Immunocytochemistry: a practical approach*. Págs. 103-109.
- 2) CAPDEVILLE, A. (1988). *Utilización de virus conjugado a fluorocromo en el estudio de la interacción virus-célula*. Tesis para optar al título de químico farmacéutico. Universidad de Valparaíso.
- 3) CIFUENTES, F. (1997). *Diagnóstico del virus IPN mediante ELISA e inmunodot en salmónidos infectados experimentalmente*. Tesis para optar al título de biólogo marino. Universidad de Valparaíso.
- 4) CIFUENTES, F., PUELLE, C., ESPINOZA, J.C. *et al.* (1997) *Utilización de un anticuerpo monoclonal en el diagnóstico directo e indirecto del virus IPN en peces infectados experimentalmente*. *Arch. med. vet.*, 1999, vol.31, no.2, p.219-229. ISSN 0301-732X.
- 5) CLOSE, B Y COL. (1995) *Recomendaciones para la eutanasia de animales de experimentación*. DGXI comisión Europea. Parte 1.
- 6) COUVE, E Y COL. (1992). *Infectious pancreatic necrosis virus internalization and endocytic organelles in CHSE-214 cell*. *Cell.biol.Int.Rep.* Págs. 899-909.
- 7) DOBOS, P. (1976). *Biophysical studies of Infectious Pancreatic Necrosis Virus*. *Journal of Virology*. American society of microbiology. Pág. 150 – 159.
- 8) DOBOS, P. (1995). *The molecular biology of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV)*. *Annual review of fish diseases*. Vol.5, pág. 25-54.

- 9) DONALD PIPER, BRUCE L. NICHOLSON, AND JAMES DUNN. (1973). *Immunofluorescent Study of the Replication of Infectious Pancreatic Necrosis Virus in Trout and Atlantic Salmon Cell Cultures*. *Infect.immun.* 8 pág. 249-254.
- 10) DORSON, M. (1982) *infectious pancreatic necrosis of salmonids: present status of knowledge concerning de viruses and the possibilities of controlling the disease*. *Bull.Franc.Off. Epizoot.vol 87, Pág. 405.*
- 11) ESPINOZA, J.C. Y COL. (1993). *Reactividad de dos anticuerpos monoclonales preparados contra el virus de la necrosis pancreática infecciosa*. *Acta microbiológica*. Pág. 23-32.
- 12) ESPINOZA, J.C. (1996). *Efecto del pH en el mecanismo de penetración del virus de la necrosis pancreática infecciosa*. Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias Microbiológicas. Universidad Católica de Valparaíso.
- 13) ESPINOZA JC, G FARÍAS, M SOLER, J KUZNAR. (1985). *Identity between infectious pancreatic necrosis virus VR-299 and a Chilean isolate*. *Intervirology*. 24, pág. 58-60.
- 14) ESPINOZA, J.C Y KUZNAR, J.(1997) *infectious pancreatic necrosis virus does not require acid compartments for entry into cells*. *Arch. Virol.* In press.
- 15) ESTAY, A Y COL. (1990). *Further analysis on the structural proteins of infectious pancreatic necrosis virus*. *Virus research*. Págs. 85-96.
- 16) ESTAY, F Y COL. (1994). *Biología del desarrollo y reproducción artificial en la trucha Arco Iris*. Valparaíso. Págs.17-18; 403-416.
- 17) EVERITT, E. (2003). *infectious pancreatic necrosis virus (IPNV): the structure and replication of a salmonid fish virus*. Lund University, Sweden.
- 18) FLORES, H. (1995). *Cultivo de salmones en Chile*. Apuntes 2do Curso Interamericano de Peces Marinos. UCN, Coquimbo, págs. 182-186.

- 19) FRYER, J. (1989). *Ictiopatología: enfermedades de etiología bacteriana y viral en salmónidos*. Curso post título, Universidad de Chile. Págs. 28.1-28.6.
- 20) HARLOW, E Y COL. (1988) *Antibodies, a laboratory manual*. USA, Pág.139-173.
- 21) HILL, B. J Y WAY,K. (1995) *serological classification of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) and other aquatic birnavirus*. Annual review of fish diseases. Págs. 55-57.
- 22) KINKELIN, P Y COL. (1992). *Tratado de enfermedades de los peces*. 2° edición. España. Pags. 64-68; 243-246.
- 23) KIRSINGER, M. (1996). *Diagnóstico del virus de la necrosis pancreática infecciosa mediante método de inmunodot*. Tesis para optar al título de químico farmacéutico. Universidad de Valparaíso.
- 24) KUZNAR, J. Y COL. (1995). *Attachment and entry of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) into CHSE-214 cells*. Arch. Virol. Vol. 140. págs. 1833-1840.
- 25) MARONI, K Y COL. (2003). *IPN in salmonids, a review*. Fisheries and acuaculture industries research Fund (FHF), Norwegian Research Council (NFR). Noruega.
- 26) MCALLISTER PE, J BEBAK. (1997). *Infectious pancreatic necrosis virus in the environment: relationship to effluent from aquaculture facilities*. J Fish Dis 20, 201-207.
- 27) MORTENSEN, S Y COL. (1998). *stability of an infectious pancreatic necrosis VIRUS (ipnv) isolate stored under different laboratory conditions*. Aquatic diseases organism. Vol. 33. pág. 67-71.
- 28) OSHIMA, S Y COL. (2005). *The interaction mechanism of marine birnavirus (MABV) in fish cell lines*. Virus research. Vol.55, págs. 133-144.

- 29) PUELLE, C. (1997). *Optimización de un método de diagnóstico del virus IPN mediante inmunofluorescencia*. Tesis para optar al título de químico farmacéutico. Universidad de Valparaíso.
- 30) ROBERTS, R. (1974). *Enfermedades de la trucha y el salmón*. Zaragoza, España. Editorial Acribia. Págs. 78-111.
- 31) RODRIGUEZ SAINT-JEAN, S Y COL. (2003). *Infectious pancreatic necrosis virus: biology, patogénesis, and diagnostic methods*. Advances in virus research, vol. 62. Málaga, España. Elsevier. Págs. 113-151.
- 32) RUSSEL, K AND PHILLIP, C. (1972). *Microscopical and Biochemical characterization of Infectious Pancreatic Necrosis Virus*. J Virol, 10 pág. 824-834.
- 33) TU K-C, R SPENDLOVE, R GOEDE. (1974) . *Immunofluorescent cell assay of infectious pancreatic necrosis virus*. Appl Microbiol 27, pág. 579-593.
- 34) WEDEMAYER, G.A. (1970). *The role of stress in the disease resistance of fishes*. American fish society special publication. Pág- 30-35.