

STUDI ISTOCHIMICI ED IMMUNOISTOCHIMICI SULLA MALATTIA PROLIFERATIVA RENALE DEI SALMONIDI

MARIN DE MATEO M. ¹, ADAMS S. ², CASTAGNARO M. ³

¹*Laboratorio de Biologia Animal, Barcelona (SP)*

²*Institute of Aquaculture (Scozia)*

³*Dipartimento di Patologia Animale, Torino*

INTRODUZIONE

La malattia proliferativa renale (PKD) è una parassitosi sistemica dei salmonidi provocata da un protozoo mixosporidio di incerta classificazione (PKX) che colpisce in modo grave e sistematico il rene determinando una nefrite granulomatosa diffusa (1). Descritta in numerosi paesi europei ed extraeuropei (2), la PKD è responsabile di gravi perdite economiche nei paesi nei quali l'allevamento dei salmonidi è più sviluppato (3). Sebbene la diagnosi della malattia non sia difficile in relazione all'incidenza stagionale, al comportamento clinico ed alle lesioni anatomico-istopatologiche, nessuno dei metodi convenzionali di diagnosi si basa sull'utilizzo di leganti specifici del PKX. Allo scopo di migliorare gli strumenti diagnostici e di studiare le caratteristiche antigeniche del PKX sono state analizzate sezioni renali di diversi salmonidi di allevamento attraverso il metodo istochimico delle lectine e quello immunoistochimico con l'utilizzo di un anticorpo monoclonale da noi prodotto (4).

MATERIALE E METODI

Sezioni renali ed esami per impronta effettuati su diverse specie di salmonidi (trota iridea e fario, salmoni dell'Atlantico e del Pacifico) provenienti da diversi paesi europei (Italia, Francia, Gran Bretagna, Irlanda, Spagna) e del Nord America (Stati Uniti e Canada) colpiti da PKD sono stati analizzati con diverse tecniche istochimiche ed immunoistochimiche.

Per la tecnica istochimica delle lectine sono state utilizzate undici diverse lectine biotinate (Tab. 1) (Sigma Co) ed il complesso ABC (Vector) secondo

Tabella 1 - Lectine utilizzate nello studio

Origine della lectina	Acronimo	Concentrazione d'uso ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	Zucchero specifico
<i>Arachis hypogea</i>	PNA	20	Gal-b-(1-3)GalNAc
<i>Concanavalia ensiformis</i>	Con-A	10	α -D-Man
<i>Dolichos biflorus</i>	DBA	20	α -D-GalNAc
<i>Glycine max</i>	SBA	20	D-GalNAc
<i>Griffonia simplicifolia</i>	GS-I	50	α -D-Gal
<i>Lens culinaris</i>	LCA	20	α -D-Man
<i>Lycopersicon esculentum</i>	LEA	50	GlcNAc
<i>Phytolacca americana</i>	PWM	50	GlcNAc
<i>Ricinus communis</i>	RCA-I	50	b-D-Gal
<i>Triticum vulgare</i>	WGA	50	b-GlcNAc/NeuNAc
<i>Ulex europaeus</i>	UEA-I	20	α -L-fucosio

Gal = Galattoso; GalNAc = N-Acetil-galattosamina; Man = Mannoso; GlcNAc = N-Acetil-glicosamina; NeuNAc = Acido acetil-neuraminico (acido sialico).

il protocollo già descritto (5).

L'utilizzo della tecnica istochimica delle lectine per gli esami su impronta abbiamo utilizzato lectine biotinate (Sigma Co) ed avidina D fluoresceinata (Vector) secondo il protocollo descritto da Hedrick e al (6).

Per lo studio immunoistochimico abbiamo utilizzato l'anticorpo Mab12 secondo la tecnica indicata da Adams et al. (7) ed un anticorpo secondario anti-topo da capra (Sigma Co.).

Infine, sia la lectina GS-I che l'anticorpo Mab12 sono stati incubati simultaneamente sulle medesime sezioni utilizzando come marcante fluorescente il complesso fluoresceina-avidina D (Vector) ed un anticorpo secondario anti-topo marcato con rodamina (Organon Tecnika), rispettivamente (8).

RISULTATI E DISCUSSIONE

Istochimica delle lectine

I risultati ottenuti vengono schematizzati nella Tabella 2.

Occorre innanzitutto sottolineare come il PKX presenta una positività per molti residui glicidici ad eccezione dell' α -L-fucosio (negatività per la lectina UEA-I). Ci sembra inoltre interessante notare come quasi tutte le lectine si leghino alle cellule secondarie (PKX-CS) con un'affinità minore rispetto a quelle primarie (PKX-CP) (Tab. 2). La conoscenza della componente

Tabella 2 - Distribuzione dei legami lectinici in reni di salmonidi affetti da PKD.

Lectina	PRX-CP	PRX-CS	Linfociti	Macrofagi	Tubuli renali
PNA	+	-	+/-	+++	+++
Con-A	+++	+	++	++	++
DBA	+/-	-	-	-	-
SBA	+/-	-	-	+/-	++
GS-I	+++	++	-	-	+++
LEA	++	+	++	+++	+++
LCA	+	-	++	+++	+++
PWM	+++	++	+++	+++	++
RCA-I	+++	+	+++	+++	+++
WGA	+	-	++	+++	+++
UEA -I	-	-	-	-	-

PKX-CP = Cellula primaria del PKX; PKX-CS = Cellule secondarie del PKX

glicidica potrebbe divenire un utile strumento per la determinazione della classificazione del parassita (9) e per la comprensione dei meccanismi patogenetici in cui sono coinvolte sostanze glicidiche (10).

L'osservazione sicuramente più interessante è rappresentata dalla quasi esclusiva specificità della lectina GS-I per le cellule del PKX. Tale specificità è presente in tutte le specie di salmonidi osservate senza riguardo alcuno alle aree di provenienza geografica. La stessa lectina riconosce il parassita negli esami rapidi per impronta permettendo così una diagnosi precisa anche quando la malattia non è clinicamente conclamata ed il basso numero dei protozoi precluderebbe una loro osservazione diretta.

Infine, il legame fra lectina PNA e le principali cellule infiammatorie (macrofagi e linfociti) potrà essere utilizzato per valutare la reazione linfo-macrofagica, responsabile secondo molti Autori della eliminazione del parassita dall'ospite (11).

Tecniche immunoistochimiche

L'anticorpo monoclonale prodotto Mab12 riconosce sia le forme sporogoniche che quelle extrasporogoniche del PKX in tutte le specie di salmonidi osservate. Inoltre, analogamente a quanto osservato per la lectina GS-I (Tab. 2), il determinante antigenico contro cui reagisce l'anticorpo è presente anche sulla superficie luminale dei tubuli renali. Questo fenomeno permette di ipotizzare una identità o una stretta relazione tra recettore lectinico per la GS-I ed il determinante antigenico del Mab12.

Questa ipotesi è ulteriormente rafforzata dai dati ottenuti con la doppia marcatura: l'incubazione di sezioni di rene con PKX con la lectina GS-I impedisce il successivo legame con l'anticorpo Mab12 (8).

CONCLUSIONI

Le tecniche utilizzate hanno permesso una più approfondita conoscenza dei glicocongiugati del PKX ed un miglioramento nello studio quantitativo e qualitativo su sezioni istologiche e negli esami rapidi per impronta delle fasi del ciclo vitale del parassita. I risultati del presente studio e le prospettive future che da esso scaturiscono possono essere così schematicamente riassunti:

1. La lectina GS-I rappresenta uno strumento specifico, economico e disponibile in commercio per diagnosi rapida, precoce e sicura della PKD nei salmonidi e permette inoltre valutazioni quantitative del protozoo .

2. La messa a punto di metodiche specifiche potrebbe risultare importante per la determinazione delle prime forme infettanti del PKX e/o delle forme nell'ospite intermedio.

3. Pur esistendo diversità quantitative fra le forme sporogoniche ed extrasporogoniche del PKX, si osserva una comunanza antigenica fra i PKX presenti in diverse zone geografiche ed infettanti diverse specie di salmonidi.

4. Esiste una identità o una stretta correlazione tra il recettore per la lectina GS-I ed il determinante antigenico dell'anticorpo Mab12.

5. Infine, la produzione di un anticorpo monoclonale specifico per il PKX potrà essere utilizzata per l'isolamento ad uno stato più puro del parassita, per una determinazione del titolo anticorpale dei pesci infetti e per la messa a punto di un vaccino.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Clifton Hadley R.S., Bucke D., Richards R.H. - *Proliferative kidney disease of salmonid fish: a review*. J. Fish. Dis., 7, 363-377, 1984.
- 2) Marin de Mateo M., Castagnaro M., Ghittino C. - *La malattia proliferativa renale nei salmonidi*. Obiett. Doc. Vet., 6, 25-30, 1992.
- 3) Hedrick R.P., MacConell, de Kinkelin P. - *Kidney disease of Salmonid fish*. Ann. Rev. Fish Dis., 277-290, 1993.
- 4) Adams A., Richards R.H., Marin de Mateo M. - *Development of monoclonal antibodies to PK'X', the causative agent of proliferative kidney disease*. J. Fish Dis., 15, 515-521, 1992.

- 5) Castagnaro M., Marin de Mateo M., Ghittino C., Hedrick R.P. - *Lectin histochemistry and ultrastructure of rainbow trout *Onchorhynchus mykiss* kidneys affected by proliferative kidney disease*. Dis. Aquat. Org., 10, 173-183, 1991.
- 6) Hedrick R.P., Marin M., Castagnaro M., Monge D., de Kinkelin P. - *Rapid lectin-based staining procedure for the detection of the myxosporean causing proliferative kidney disease in salmonid fish*. Dis. Aquat. Org., 13, 129-132, 1992.
- 7) Adams A., Marin de Mateo M. - *Immunohistochemical detection of fish pathogens*. In: Techniques in Fish Immunology. FITC-3. SOS Publications, 133-144, New Jersey, USA, 1994.
- 8) Marin de Mateo M., Adams A., Richards R.H., Castagnaro M., Hedrick R.P. - *Monoclonal antibody and lectin probes recognize developmental and sporogonic stages of PKX, the causative agent of proliferative kidney disease in European and North American salmonid fish*. Dis. Aquat. Org., 15, 23-29, 1993.
- 9) Lis H., Sharon N. - *Lectins: properties and applications to the study of complex carbohydrates in solution and on cell surfaces*. In: Ginsburg V., Robbins P.W., Biology of Carbohydrates, Vol. II, John & Wiley Sons, New York, 1-85, 1984.
- 10) Mahmoud A.A.F. - *Parasitic protozoa and helminths: biological and immunological challenges*. Science, 246, 1015-1022, 1989.
- 11) MacConell E., Smith C., Hedrick R.P., Speer C.A. - *Cellular inflammatory response of rainbow trout to the protozoan parasite that causes proliferative kidney disease*. J. Aquat. Anim. Hlth, 1, 108-118, 1988.