



UNIVERSIDAD DE CHILE
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

Evaluación de la respuesta inmune de salmón del Atlántico (*Salmo salar*) a complejos inmunes con *Piscirickettsia salmonis*

Memoria para optar al título de Bioquímico

Patrocinante

Dr. Dante Miranda
Departamento de Bioquímica y
Biología Molecular
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas
Universidad de Chile

Director de memoria

Dr. Beltrán Jaureguiberry
Laboratorio de Investigación y Desarrollo
Veterquímica

EDITH VERONICA SOTO LAMPE

Santiago de Chile, 2007

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi tutor Dr. Beltrán Jaureguiberry, por darme la oportunidad de acceder a un innovador campo de investigación y por confiar en mis capacidades.

A Claudia Acevedo, Susana Velásquez y Rubén Avendaño por sus valiosos consejos y apoyo profesional.

A la Dra. Patricia Olivares por facilitarme el material necesario para realizar mis estudios.

A Valeska Simon por su valiosa colaboración.

A Maggie, Carito, Natalia y Gloria, por compartir amablemente su experiencia laboral y con ello facilitar el desarrollo de mi trabajo.

A mis compañeros del laboratorio de I+D, por su ayuda y los momentos compartidos.

A mi familia y amigos que me han orientado y acompañado durante todas las etapas de mi formación profesional.

Y a Pato por apoyarme (y soportarme) en las buenas y en las malas.

RESUMEN

“Evaluación de la respuesta inmune de salmón del Atlántico (*Salmo salar*) a complejos inmunes con *Piscirickettsia salmonis*”

El desarrollo de la salmonicultura chilena ha sido acompañado por la aparición de una serie de patologías. Actualmente, la enfermedad infecciosa responsable de las mayores mortalidades y el consiguiente impacto económico en la industria, es la Septicemia Rickettsial de los Salmónidos (SRS) o piscirickettsiosis.

Debido a que los tratamientos con antibióticos no han proporcionado un control eficaz de los brotes infecciosos, se han desarrollado vacunas como método de prevención contra la enfermedad. Sin embargo, la eficacia de vacunas comerciales basadas en bacterinas de *Piscirickettsia salmonis*, ha mostrado resultados variables, y la información sobre la efectividad de formulaciones experimentales basadas en proteínas recombinantes y en ácidos nucleicos en pruebas experimentales y de campo es escasa, lo cual pone de manifiesto la necesidad de investigar nuevas alternativas en el desarrollo de vacunas.

El objetivo central de este estudio fue comparar el efecto de una formulación basada en complejos inmunes con *P. salmonis* inactivada con el de una formulación preparada con la bacterina libre, sobre el sistema inmune de salmón del Atlántico (*Salmo salar*). De esta forma, se evaluaron algunos parámetros de la respuesta inmune innata como el estallido respiratorio de los leucocitos y la actividad de la lisozima, los cuales no se habían estudiado previamente con este patógeno y en el modelo animal empleado. Además, se evaluó la respuesta inmune humoral adquirida, comparando el nivel de anticuerpos en peces inmunizados.

La inmunización con complejos inmunes tuvo un efecto positivo sobre los mecanismos innatos, ya que indujo una mayor actividad de los leucocitos comparado con la bacterina libre, lo cual fue demostrado por el aumento de la actividad de la lisozima en suero, y la producción de ión superóxido. Por otro lado,

no se detectaron diferencias significativas en la producción de anticuerpos entre los grupos inmunizados y el grupo control, y la respuesta observada en este grupo pudo deberse a la exposición previa de salmón del Atlántico a microorganismos que comparten estructuras antigénicas con *P. salmonis*, lo cual fue demostrado en el ensayo de aglutinación por la reactividad cruzada de los sueros con *Arthrobacter sp.* y *Flavobacterium psychrophilum*. En general, bajo las condiciones del estudio, la formulación con la bacterina libre mostró una tendencia a disminuir las respuestas innatas y adquiridas, sugiriendo un efecto inmunosupresor de *P. salmonis* en salmón del Atlántico.

La estimulación de leucocitos de salmón *in vitro*, no mostró diferencias significativas entre los tratamientos con complejos inmunes y la bacterina libre. Sin embargo sugirió una respuesta dependiente de la dosis agregada.

Para cumplir con los objetivos planteados fue necesario implementar una serie de técnicas inmunológicas que permitirán, en próximos estudios, correlacionar los resultados obtenidos en los distintos ensayos con el nivel de protección inducido y su duración, de manera que aumentará nuestro conocimiento de la inmunología de *Salmo salar*, y hará posible predecir la efectividad de vacunas experimentales en etapas tempranas posteriores a la inmunización.

ABSTRACT

“Evaluation of immune response of Atlantic salmon (*Salmo salar*) to immune complexes derived from *Piscirickettsia salmonis*”

Development of Chilean salmon industry has been accompanied by the appearance of a series of diseases. Today, the infectious disease responsible of the highest mortalities and the resulting economic losses of the industry is salmonid rickettsial septicemia (SRS) or piscirickettsiosis.

Because the antibiotic therapies have failed to provide an effective control system of outbreaks, vaccines have been developed as a prevention method. However, effectiveness of commercial vaccines based on *P. salmonis* bacterins, has shown variable results, and there is a lack of information about the effectiveness of experimental vaccines based on recombinant proteins or nucleic acids in laboratory and field trials, which reveals the need of research on new approaches in the field of vaccine development.

The central aim of this study was to compare the effect of a formulation based in immune complexes of inactivated *P. salmonis* with the effect of another one prepared with the free bacterin, on the immune system of Atlantic salmon (*Salmo salar*) Therefore, some innate parameters as leucocyte respiratory burst and lysozyme activity, were evaluated. These parameters had not been previously studied with this pathogen and in the fish model employed. In addition, the adaptive humoral immune response was evaluated by comparing the antibody levels in immunized fish.

Immunization with immune complexes had a positive effect on innate mechanisms, and led to a greater activity of leucocytes, which was shown by the increased lysozyme activity in serum, and superoxide anion production. On the other hand, statistically significant differences in antibody production were not detected between immunized and control groups, and the observed response inside

this group may be due to previous exposure of Atlantic salmon to microorganisms that share antigenic structures with *P. salmonis*, which was shown by the cross-reactivity of the assessed sera with *Arthrobacter sp.* and *Flavobacterium psychrophilum* in the agglutination assay. Under the conditions of this study, the free bacterin based formulation showed a tendency to diminish the innate and acquired immune responses, suggesting an immunosuppressive effect of *P. salmonis* on Atlantic salmon.

In vitro stimulation of salmon leucocytes didn't show significant differences between treatments with immune complexes or bacterin alone. However, it suggested a dose-dependent response.

To achieve the aims of this study, it was necessary to develop several immunological techniques which will allow, in future researches, make a correlation between the obtained results of all this different assays with the induced protective level and its duration, in such a way that will increase our knowledge of *Salmo salar* immunology, and will allow the prediction of experimental vaccines effectiveness at early stages after immunization.

INDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS	i
RESUMEN	ii
ABSTRACT	iv
ÍNDICE GENERAL	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ABREVIATURAS	x
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Generalidades	1
1.2. <i>Piscirickettsia salmonis</i>	2
1.3. Prevención y tratamiento de la enfermedad	3
1.3.1. Medidas sanitarias	3
1.3.2. Quimioterapia	3
1.3.3. Vacunas	4
1.4. Sistema inmune en peces	5
1.4.1. Inmunidad Innata	6
1.4.2. Inmunidad Adquirida	8
1.4.3. Integración de las respuestas innata y adquirida	9
1.4.4. Receptores Fc en peces	11
1.4.5. Respuesta inmune frente a <i>P. salmonis</i> e interacción <i>P. salmonis</i> -huésped	12
2. HIPÓTESIS	15

3. OBJETIVOS	15
3.1. Objetivo General	15
3.2. Objetivos Específicos	15
4. MATERIALES	16
4.1. Material biológico	16
4.1.1. Aislados bacterianos	16
4.1.2. Animales	16
4.1.3. Anticuerpos	16
4.2. Reactivos	17
4.2.1. Medios de cultivo y suplementos de cultivo	17
4.2.3. Reactivos generales	17
5. MÉTODOS	18
5.1. Medios y condiciones de cultivo	18
5.2. Cuantificación de <i>P. salmonis</i> inactivada	18
5.3. Determinación proporción óptima antígeno-anticuerpo	19
5.4. Formulación de antígenos	20
5.5. Esquemas de Inmunización	20
5.5.1. Inmunización de conejos	20
5.5.2. Inmunización de salmones	21
5.6. Estudio de la respuesta inmune innata celular	21
5.6.1. Preparación de suspensión de microcarriers	21
5.6.2. Aislamiento de leucocitos de la cabeza del riñón de salmón	22
5.6.3. Cuantificación de células	22
5.6.4. Estallido respiratorio de leucocitos de salmón	22
5.6.5. Medición del estallido respiratorio de salmones Inmunizados	23
5.6.6. Estimulación de leucocitos de salmón <i>in vitro</i>	23
5.7. Estudios de la respuesta inmune humoral innata y adquirida	24
5.7.1. Muestras de suero para ensayos de ELISA y actividad de lisozima	24
5.7.2. Ensayo de ELISA	25

5.7.3. Ensayo de la lisozima	25
5.7.4. Ensayo de aglutinación	26
5.8. Análisis estadístico	26
6. RESULTADOS	27
6.1. Cuantificación de <i>P. salmonis</i> por citometría de flujo	27
6.2. Determinación de proporción óptima antígeno-anticuerpo para formación de complejos inmunes con <i>P. salmonis</i>	29
6.3. Evaluación de la respuesta inmune innata de salmones del Atlántico inmunizados con <i>P. salmonis</i> libre y complejada	33
6.3.1. Medición del estallido respiratorio	33
6.3.2. Medición de la actividad de la lisozima	35
6.4. Evaluación de la respuesta inmune humoral adaptativa	38
6.4.1. Medición de la producción de anticuerpos	38
6.4.2. Ensayo de aglutinación	40
6.5. Estallido respiratorio de leucocitos de salmón del Atlántico estimulados <i>in vitro</i> con <i>P. salmonis</i> libre y complejada	41
7. DISCUSIÓN	43
8. CONCLUSIONES	51
9. PROYECCIONES	52
10. REFERENCIAS	53

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Interface entre la respuesta inmune innata y adquirida	9
Figura 2. Esquemas de ensayo del estallido respiratorio en placas de 24 y 96 pocillos	24
Figura 3. Cuantificación de <i>P. salmonis</i> por citometría de flujo	28
Figura 4. Citometría de flujo de complejos inmunes con <i>P. salmonis</i>	30
Figura 5. Determinación de la dilución óptima de antisuero para formar complejos inmunes con <i>P. salmonis</i>	31
Figura 6. Curva de precipitación de complejos inmunes con <i>P. salmonis</i>	32
Figura 7. Reducción del NBT en macrófagos de la cabeza del riñón de salmones inmunizados con <i>P. salmonis</i> libre y complejada	34
Figura 8. Efecto de la inmunización con formulaciones con <i>P. salmonis</i> en la actividad de la lisozima de salmones	36
Figura 9. Niveles de anticuerpos en salmones incluidos en el ensayo de Inmunización	38
Figura 10. Reducción del NBT por leucocitos de salmón del Atlántico estimulados in vitro con <i>P. salmonis</i> libre y complejada	42

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Diferencias estadísticas en la actividad de lisozima medida en los grupos inmunizados y control, analizados individualmente	36
Tabla 2. Diferencias estadísticas en el nivel de anticuerpos medido en los grupos inmunizados y control, analizados individualmente	39
Tabla 3. Ensayo de aglutinación de sueros de salmones inmunizados con <i>P. salmonis</i> libre y complejada	41

ABREVIATURAS

µg	microgramo
µL	microlitros
ADN	ácido desoxirribonucléico
ARNr:	ARN (ácido ribonucleico) ribosomal
BKD	Enfermedad bacteriana del riñón
BSA	albúmina de suero bovino
CI	complejos inmunes
cols.	colaboradores
DMSO	dimetilsulfóxido
dpi	días post-inmunización
ELISA	(Enzyme Linked Inmunoabsorvent Assay) ensayo inmunoenzimático
ERO	especies reactivas de oxígeno
EthD-1	homodímero de etidio-1
FITC	isotiocianato de fluoresceína
FSC	dispersión frontal de la luz
g/ grs	gramo/ gramos
h	hora/ horas
HRP	peroxidasa de Rábano
Ig	inmunoglobulina
IgG	inmunoglobulina tipo G
IgM	inmunoglobulina tipo M
LPS	lipopolisacárido
M	molar
mg	miligramo (s)
min	minutos
mM	milimolar
mL	mililitro
NBT	azul de nitrotetrazolio

nm	nanómetros
NI	no inmune
PBS	tampón fosfato salino
p.i.	post-inmunización
PRS	porcentaje relativo de supervivencia
psi	(pounds per square inch) libra por pulgada cuadrada
RA	riñón anterior
RFc	receptor para el dominio Fc
rpm	revoluciones por minuto
SFB	suero fetal bovino
Sli	suero inmune con el complemento inactivado
SNi	suero normal con el complemento inactivado
SRS	septicemia rickettsial de los salmónidos
SSC	dispersión ortogonal de la luz
T	temperatura
TCID ₅₀	dosis infectiva del 50% del cultivo celular
TMB	Tetrametilbencidina
TYE	medio de cultivo Agar triptona extracto de levadura
U	unidades
VEE	virus de la encefalitis equina venezolana

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Generalidades

La industria salmonicultora se ha convertido en uno de los sectores más exitosos de la economía nacional, siendo dominada por el cultivo de salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*), trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) y salmón del Atlántico (*Salmo salar*), el cual ha llegado a ser la mayor especie cultivada a nivel mundial (Luco, 2003; www.bibliotecnica.upc.es/bib280/cursmari/parte3.pdf). El crecimiento de esta industria ha sido tal que en la actualidad Chile es el segundo productor del mundo después de Noruega (Salmon Chile 2006).

El carácter intensivo de los cultivos ha favorecido la aparición de una serie de enfermedades que han provocado importantes mortalidades y el consiguiente impacto económico en la industria. Los agentes patógenos descritos en los sistemas de cultivo normalmente están presentes en las poblaciones de peces silvestres; sin embargo, en los ambientes naturales rara vez provocan mortalidades debido a la ausencia de condiciones estresantes como el manejo, transporte, alta densidad poblacional y cambios en la calidad del agua, presentes en las instalaciones de cultivo (Toranzo y cols., 2005).

Actualmente, la enfermedad infecciosa considerada como la principal causa de mortalidades en la salmonicultura nacional es la Septicemia Rickettsial de los Salmónidos (SRS) o piscirickettsiosis, provocando anualmente pérdidas superiores a los cien millones de dólares (Bravo y Midtlyng, 2007).

El primer brote de piscirickettsiosis se describió en 1989, provocando altas mortalidades en salmónes coho cultivados en su fase de agua de mar. Poco tiempo después se reportaron mortalidades en todas las demás especies de salmónidos cultivadas bajo las mismas condiciones de crianza (Cvitanich y cols., 1991) y tanto la enfermedad como su agente causal se identificaron en las especies susceptibles en agua dulce (Bravo, 1994; Gaggero y cols., 1995). El patógeno aislado de peces

infectados fue identificado como una bacteria intracelular similar a rickettsia y se denominó *Piscirickettsia salmonis* gen. nov., sp. nov. (*P. salmonis*).

A partir del primer brote descrito en Chile, tanto la enfermedad como el patógeno se han reportado en una amplia distribución geográfica. En Canadá la piscirickettsiosis ha causado pérdidas en cultivos marinos de salmón Chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*), y salmón rosado (*Oncorhynchus gorbusha*). La bacteria se ha aislado también a partir de salmones del Atlántico infectados en Irlanda, Escocia y Noruega. En huéspedes no salmónidos, sólo se ha confirmado la infección por *P. salmonis* en lubina blanca (*Altractoscion nobilis*) cultivada en California, USA (Fryer y Hedrick, 2003). Sin embargo, las epizootias severas sólo ocurren en las pisciculturas del sur de Chile.

1.2. *Piscirickettsia salmonis*

Esta especie, única integrante del género *Piscirickettsia*, pertenece a la familia *Piscirickettsiaceae* dentro de las Gammaproteobacterias (Fryer y Hedrick, 2003). Es una bacteria acapsulada, Gram negativa, inmóvil, aeróbica, de diámetro entre 0,5-1,5 µm. Es pleomórfica, predominantemente cocoide. Se multiplica por fisión binaria en el interior de vacuolas citoplasmáticas dentro de las células de huéspedes infectados (Yuksel y cols., 2006).

Desde su identificación, se ha considerado a *P. salmonis* como un patógeno de peces intracelular obligado, que se cultiva en numerosas líneas celulares de peces, como CHSE 214, donde su crecimiento es controlado por la aparición gradual de efecto citopático (Almendras y Fuentealba, 1997). También se ha cultivado con éxito en una línea celular de insecto (Birkbeck y cols., 2004). Recientemente se informó el desarrollo de una metodología que permitió, por primera vez, obtener aislamientos de la bacteria en medio de cultivo artificial (www.aquagestion.cl/areas/diagnostico/nsrs.htm). El potencial carácter extracelular de la bacteria se había sugerido previamente en un estudio con preparaciones semipurificadas de la bacteria, donde se observó una mayor supervivencia de la bacteria en agua salada, mientras que la bacteria no sobrevivió en suspensiones de agua dulce (Lannan y Fryer., 1994).

1.3. Prevención y tratamiento de la enfermedad

1.3.1. Medidas sanitarias

Algunos centros de cultivo han implementado una serie de prácticas sanitarias con el fin de disminuir las pérdidas ocasionadas por la infección con *P. salmonis*. Estas medidas incluyen mantener bajas densidades poblacionales, no ocupar ciertas áreas para el cultivo por un período para permitir su recuperación, y prevenir la transmisión horizontal manteniendo sólo una clase de pez anual en un sitio dado (sistema de cría todo dentro todo fuera) (Fryer y Hedrick, 2003).

1.3.2. Quimioterapia

El uso de drogas antimicrobianas ha sido el principal método de tratamiento de casos de la enfermedad en curso. Ensayos *in vitro* han mostrado que la replicación de *P. salmonis* es inhibida por estreptomina, gentamicina, tetraciclina, cloranfenicol, eritromicina, ácido oxolínico, claritromicina, y sarafloxacina, y que es resistente a penicilina (Almendras y Fuentealba, 1997). Actualmente los antibióticos más usados son flumequina, ácido oxolínico, florfenicol y oxitetraciclina, administrados oralmente mezclándolos con el alimento de los peces. La oxitetraciclina se administra también a través de inyección intraperitoneal (Bravo y cols., 2005; www.fip.cl/prog_subprog/acuicultura.htm). Sin embargo, en muchos casos la enfermedad no se ha controlado, asociándose la inconsistencia de estos tratamientos al desarrollo de resistencia, así como también a que no se alcancen concentraciones intracelulares suficientes de la droga para eliminar la bacteria (Fryer y Hedrick, 2003).

Otras complicaciones asociadas a los antibióticos tienen relación con su uso excesivo y poco controlado. Por ejemplo, se ha calculado que en la industria chilena se usan entre 200-250 veces más antibióticos que en Noruega. La presencia de grandes cantidades de antibióticos en las instalaciones de cultivo ha producido alteraciones de la flora bacteriana en el entorno acuático induciendo la aparición de bacterias resistentes, lo cual aumenta las posibilidades de transferencia de resistencia a bacterias de animales terrestres y patógenos humanos, lo que podría tener efectos perjudiciales para la salud animal, humana y el medioambiente (Cabello, 2006).

1.3.3. Vacunas

La ausencia de tratamientos efectivos contra la piscirickettsiosis ha acentuado la necesidad de desarrollar estrategias que prevengan la enfermedad. Una alternativa es la vacunación, ya que este método ha permitido a la industria del salmón controlar numerosas enfermedades con éxito (Somerset y cols., 2005).

Los primeros estudios en el campo de la vacunación contra piscirickettsiosis se desarrollaron utilizando preparaciones del patógeno completo inactivado con formaldehído. En salmónes coho pre-smolt vacunados intraperitonealmente con una bacterina de *P. salmonis* usando diferentes protocolos de vacunación, y posteriormente sometidos a un desafío natural, se observó una protección significativa en los peces inyectados con la bacterina menos concentrada, mientras que en los peces inyectados con la bacterina concentrada en coadyuvante las mortalidades acumuladas fueron superiores a las del grupo control, sugiriendo que bajo ciertas circunstancias las bacterinas de *P. salmonis* podrían tener efectos inmunosupresores (Smith y cols., 1997). Posteriormente se describió una respuesta dependiente de la dosis en salmónes coho inmunizados con bacterinas en coadyuvantes oleosos, obteniéndose un mayor porcentaje relativo de supervivencia (PRS) en salmónes coho inmunizados con la bacterina sin diluir (35% PRS), mientras que con la bacterina más diluida se observó una exacerbación de la enfermedad (Kuzyk y cols., 2001).

Los resultados obtenidos con preparaciones basadas en bacterinas de *P. salmonis* han provocado un aumento de la investigación en torno al uso de vacunas recombinantes. En salmónes coho inmunizados con una vacuna preparada con una lipoproteína externa de *P. salmonis*, OspA, se observó un alto nivel de protección (59% PRS), que se incrementó al incluir epítopes de célula T de la toxina del tétano y del virus del sarampión (83% PRS) (Kuzyk y cols., 2001). Otros candidatos evaluados son las proteínas de choque térmico denominadas Hsp60 y Hsp70. La formulación recombinante proporcionó un alto nivel de protección (89.6% PRS) comparado con el grupo control. Además, en suero de salmónes, se determinaron altos títulos de anticuerpos contra ambas proteínas recombinantes tres meses después de su vacunación (Wilhelm y cols., 2005). En un estudio reciente, una formulación preparada con la subunidad FigG de la estructura basal flagelar y las

chaperoninas Hsp60 y Hsp70 indujo una elevada protección (95% PRS) en salmones del Atlántico, la cual coincidió con una elevada respuesta humoral contra los componentes de la formulación, detectada hasta ocho meses después de la vacunación, sugiriendo que el uso de más de un antígeno recombinante puede potenciar la respuesta inmune. Sin embargo, los variados grados de protección alcanzados por distintas formulaciones, hacen que la selección apropiada de los antígenos sea crucial para lograr una protección exitosa (Wilhelm y cols., 2006).

La aplicación de una vacuna basada en ácidos nucleicos, también ha sido estudiada como una alternativa para el control de la piscirickettsiosis. En salmones coho inmunizados con ADN de *P. salmonis*, se detectó una respuesta humoral específica y significativamente superior a la del grupo control. Sin embargo, se observó un bajo nivel de protección atribuido, en parte, a que la elevada complejidad de una biblioteca genómica puede incluir una concentración muy baja de los genes hipotéticamente efectivos. Así, la obtención de un producto eficaz implica la realización de inmunizaciones y desafíos sucesivos con grupos de menor complejidad para identificar a los genes responsables de la protección (Miquel y cols., 2003).

Desde 1999 hasta el 2003 la vacunación contra piscirickettsiosis aparentemente disminuyó. El motivo principal de este descenso tendría relación con las dudas sobre la eficacia de las vacunas comercialmente disponibles ya que, a diferencia de lo observado en otras enfermedades bacterianas, su aplicación no ha reducido el uso de antibióticos (Bravo y Midtlyng, 2007). Además, la información sobre la eficacia de estas vacunas en condiciones experimentales y de campo es escasa.

1.4. Sistema inmune en peces

En teleósteos, el timo, el bazo y el riñón son los principales órganos hematopoyéticos, siendo este último funcionalmente equivalente a la médula ósea de los mamíferos. En estos órganos se originan y diferencian numerosas células del sistema inmune, como linfocitos T y B, granulocitos y monocitos/macrófagos, cuya actividad da cuenta de la inmunocompetencia de los peces (Zapata y cols., 2006). En salmónidos como trucha y salmón del Atlántico, estas poblaciones celulares se

han identificado (Pettersen y cols., 2000; Kollner y cols., 2001; Jansson y cols., 2003), y al igual que en vertebrados superiores, son responsables de la ejecución de la respuesta inmune innata y adquirida frente a la invasión de microorganismos patógenos.

1.4.1. Inmunidad Innata

La mayor importancia de la respuesta innata de los peces, reside en su capacidad de desencadenar una serie de mecanismos en un corto lapso, frente a una amplia gama de microorganismos a través del reconocimiento de características altamente conservadas en su superficie, como el LPS, las cuales son conocidas colectivamente como Patrones Moleculares Asociadas a Patógenos (PAMPs) (Magnadottir, 2006). Además, cumple un rol muy importante en la iniciación y dirección del tipo de respuesta inmune adquirida (Dixon y Stet, 2001).

La inmunidad innata de los peces está conformada por barreras físicas como mucus, escamas y superficies mucosas (epidermis, branquias, intestinos), que bloquean la entrada de los patógenos invasores. En mucus y suero pueden encontrarse componentes humorales como lectinas, pentraxinas, proteínas del complemento, péptidos antibacterianos y lisozima (Magnadottir, 2006).

La lisozima es una enzima que rompe el enlace glucosídico β -1,4 entre el ácido *N*-acetilmurámico y la *N*-acetilglucosamina en la capa de peptidoglicano de la pared celular bacteriana, conocida por provocar la lisis predominantemente de bacterias Gram positivas y en menor grado, bajo condiciones como la presencia del complemento, de algunas bacterias Gram negativas. Sin embargo, esta enzima tiene la capacidad de neutralizar e interactuar potentemente con el lipopolisacárido (LPS) bacteriano. Se ha reportado que lisozima purificada de trucha arcoiris (*Onchorhynchus mykiss*) es capaz de inhibir el crecimiento de varias bacterias gram negativas patógenas de peces en ausencia de complemento. En varias especies de peces, se ha detectado lisozima en mucus, suero, ovas y órganos como el riñón, asociados a un alto contenido de leucocitos. Lo anterior concuerda con la idea de que monocitos/macrófagos y granulocitos son las principales fuentes de producción de la enzima (Lie y cols., 1989). En salmónidos inyectados intraperitonealmente con polisacáridos microbianos, se observó una actividad elevada de lisozima en suero; estudios posteriores *in vitro* demostraron un aumento en la producción de lisozima

en macrófagos de la cabeza del riñón de salmón del Atlántico en presencia de β -glucano de levadura y LPS bacteriano (Paulsen y cols., 2001). Además, varios reportes dan cuenta de la actividad bactericida de lisozima aislada de suero y ovas sobre patógenos de peces como *A. salmonicida* y *A. hydrophila* (Ellis, 1999).

La inmunidad innata cuenta también con un componente celular cuyas funciones son fundamentales en la defensa contra microorganismos agresores (Ellis, 2001). Si la bacteria logra penetrar en los tejidos del pez, se desencadena una respuesta inflamatoria que induce la afluencia de leucocitos como, neutrófilos y monocitos/macrófagos, considerados tradicionalmente como las principales células fagocíticas de los teleósteos. El rol fundamental de estas células es limitar la diseminación inicial y/o el crecimiento de organismos infecciosos. Una vez atrapado, son reclutadas otras células inmunes para ayudar a destruir al organismo invasor; frecuentemente, el fagocito mismo es activado para destruirlo. Las células fagocíticas almacenan en gránulos y lisosomas una serie de péptidos antimicrobianos que se liberan en el fagolisosoma después de la ingestión de un organismo extraño. La partícula fagocitada es degradada por enzimas como proteasas, nucleasas, fosfatasas, esterases y lipasas. Además, estas células eliminan a los microorganismos fagocitados a través de un mecanismo dependiente de oxígeno denominado “estallido respiratorio”, en el cual se producen especies reactivas de oxígeno (ERO), como el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el cual es transformado posteriormente en peróxido de hidrógeno, radical hidroxilo y ácido hipocloroso (Neumann y cols., 2001).

Numerosos estudios demuestran la capacidad de los fagocitos de peces de producir ERO, a través del estallido respiratorio en respuesta a la exposición a patógenos marinos o sus componentes. En macrófagos aislados de la cabeza del riñón de salmón del Atlántico la estimulación *in vitro* con LPS de bacterias patógenas y no patógenas de peces, indujo un aumento de la producción intracelular de anión superóxido de un modo dependiente de la dosis agregada (Dalmo y cols., 1995; Solem y cols., 1995). Igualmente, se ha demostrado la activación del estallido respiratorio de macrófagos de salmón del Atlántico estimulados con β -glucanos, componentes estructurales fundamentales de la pared celular de levaduras, hongos y algas, cuya administración tanto *in vivo* como *in vitro*

ha resultado en un aumento de la resistencia frente a ciertos patógenos (Bridle y cols., 2005; Brattgierd y cols., 1994; Jorgensen y cols., 1995). Además, este mecanismo se ha estudiado *in vitro* e *in vivo* en distintos salmónidos mediante la administración de importantes patógenos marinos vivos o inactivados, con una considerable similitud de la respuesta microbicida bajo diversas condiciones tales como el tipo de patógeno, la exposición a cepas virulentas y avirulentas o la presencia de factores opsonizantes. En neutrófilos de salmón del Atlántico una cepa avirulenta de *A. salmonicida* indujo una mayor producción de ERO comparada con una cepa virulenta (Lamas y Ellis, 1994). Similarmente, macrófagos de trucha arcoiris eliminaron efectivamente una cepa avirulenta de *A. salmonicida* pero no una virulenta, sin embargo cuando los macrófagos se activaron *in vivo*, ambas cepas fueron eliminadas efectivamente (Graham y cols., 1988). El rol de las ERO en la eliminación del patógeno se comprobó en cultivos de macrófagos de la cabeza del riñón sometidos a la presencia de inhibidores de componentes y productos del estallido respiratorio, en los cuales se observó un incremento de la supervivencia de la cepa avirulenta (Sharp y Secombes, 1993). Estudios con otro patógeno Gram negativo de peces, *V. anguillarum*, demostraron la activación del estallido respiratorio en macrófagos de truchas inmunizadas con bacterias inactivadas con formaldehído (Kodama y cols., 1989). También se ha reportado la activación *in vitro* del estallido respiratorio en presencia de la bacteria intracelular, Gram positiva, *R. salmoninarum*. El patógeno inactivado con calor indujo un estallido respiratorio mayor que el microorganismo vivo (Campos-Pérez y cols. 1997). Este patógeno es capaz de sobrevivir y multiplicarse en el interior de los macrófagos de peces infectados, al parecer, por su capacidad de resistir los mecanismos de degradación dentro de los macrógrafos (Bandin y cols., 1993).

1.4.2. Inmunidad Adquirida

El sistema inmune adquirido de los peces incluye mecanismos humorales y mediados por células, a cargo de las poblaciones linfocitarias B y T, respectivamente. Estas respuestas se desarrollan en un tiempo mayor que las respuestas innatas y se activan por el reconocimiento de moléculas específicas de los patógenos. Su rol principal es la generación de memoria inmunológica tras la exposición sucesiva a un patógeno, lo que constituye la base del proceso de vacunación (Shoemaker y cols., 2005).

La respuesta mediada por células depende de la presencia de células accesorias, como los macrófagos, para presentar antígenos a los linfocitos T. El procesamiento y presentación de antígenos son dirigidos por un sistema similar al complejo principal de histocompatibilidad (CPH) de mamíferos (Vallejo y cols., 1992), que difiere de éste en que los genes de clase I y II residen en grupos de ligamiento distintos, por lo que una denominación más apropiada sería genes PH. En salmónidos se han aislado y caracterizado genes de clase I y II, y se han realizado estudios funcionales de su expresión frente a patógenos virales y bacterianos (Hansen y cols., 1999; Grimholt y cols., 2003)

En teleósteos se ha descrito principalmente sólo una clase de inmunoglobulina (Ig), correspondiente a una forma tetramérica de IgM, la cual cumpliría con las diversas funciones encontradas en las otras clases de Ig de otros vertebrados. Entre las funciones asociadas a las inmunoglobulinas (Igs) específicas están la opsonización de bacterias, neutralización de toxinas o virus y una potente participación en la activación del complemento (Shoemaker y cols., 2005). Estudios sugieren la existencia de memoria inmunológica en los peces similar a la respuesta anamnésica en vertebrados superiores. Sin embargo, existen discrepancias sobre la capacidad de respuesta de los peces tras la inmunización, sosteniéndose que los peces producirían anticuerpos con baja afinidad por el antígeno, que su respuesta secundaria no sería igualmente pronunciada y que presentarían una baja maduración por afinidad (Pilstrom, 2003).

1.4.3. Integración de las respuestas innata y adquirida

El suero de los peces contiene diferentes componentes, como el complemento y las Igs, que opsonizan a los patógenos aumentando la fagocitosis y posterior eliminación de éstos por diversas células especializadas del sistema inmune. El reconocimiento de antígenos, sean estos bacterias o componentes de las mismas, por anticuerpos específicos producidos por el pez, implica la interacción entre las porciones hipervariables de los anticuerpos y epítopes del antígeno conduciendo a la formación de los denominados complejos inmunes (CI), los cuales pueden modular un amplio rango de mecanismos tanto innatos como adquiridos (Fig. 1).

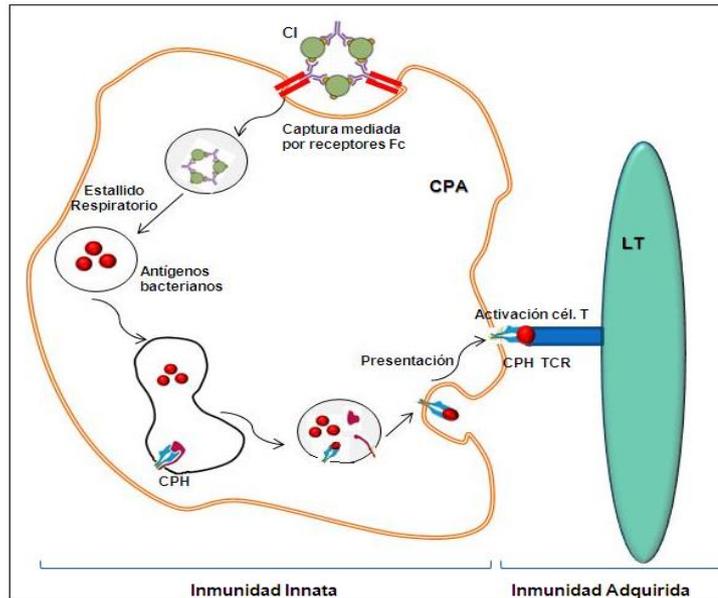


Fig. 1. Interface entre la respuesta inmune innata y adquirida. Células del sistema inmune innato como monocitos/macrófagos pueden reconocer bacterias o componentes de éstas en forma de complejos inmunes (CI) a través de receptores Fc (RFc) presentes en su superficie. Estas células fagocitan a los CI para luego eliminar a los patógenos mediante mecanismos como el estallido respiratorio, o procesarlos dando origen a péptidos que luego son presentados por moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (CPH) en la superficie celular. Los linfocitos T (LT) reconocen los antígenos así expuestos a través de receptores específicos. La activación del receptor en el LT junto con otras señales coestimuladoras, inician una cascada de eventos que conducirá a la generación de células T de memoria. (Fuente: elaboración propia).

En neutrófilos de salmón se observó una mayor producción de ERO en presencia de *A. salmonicida* opsonizada con suero normal (sin el complemento inactivado) que con SNI (suero normal con el complemento inactivado) (Lamas y Ellis, 1994). Sin embargo, se observó un aumento de la fagocitosis de éste patógeno, así como también de la actividad bactericida frente al patógeno Gram positivo *L. garvieae*, cuando macrófagos de trucha se incubaron con las bacterias opsonizadas con Sli (suero inmune con el complemento inactivado), mientras que esta actividad no se detectó al emplear SNI, demostrando que los efectos del antisuero persisten en presencia de anticuerpos específicos (Michel y cols., 1991; Barnes y cols., 2002). En contraste, aunque la fagocitosis de *R. salmoninarum* opsonizada no fue diferente a la de la bacteria libre, su supervivencia al interior de los macrófagos aumentó levemente en presencia de Sli, y fue potenciada cuando se utilizó suero inmune, sugiriendo que en conjunto el complemento y los

anticuerpos ejercerían un cierto rol protector frente a la actividad bactericida contra este patógeno (Bandin y cols., 1995).

Recientemente, un estudio demostró, *in vitro* e *in vivo*, una potente actividad fagocítica y microbiciada de células B de truchas expuestas a *A. hydrophila*, indicando además un aumento notable de la fagocitosis de la bacteria opsonizada con complemento o anticuerpos específicos. Dado que en vertebrados superiores los linfocitos B carecen de actividad fagocítica, estas observaciones apoyan la idea de que las células B evolucionaron de un tipo celular ancestral fagocítico y proporciona evidencia que permite entender la cercana relación entre los linfocitos B y los macrófagos de mamíferos sugiriendo un predecesor común con atributos de ambos tipos celulares (Li y cols., 2006). Estos resultados concuerdan con los obtenidos en un reporte anterior en el que CI preparados con gama globulina humana y antisuero de salmón del Atlántico se unieron a leucocitos enriquecidos con una población similar a los linfocitos B (O'Dowd y cols., 1999).

Por otro lado, las células accesorias cumplen un rol esencial en el procesamiento y presentación antigénica. Estudios *in vitro* en bagre (*Ictalurus punctatus*) han demostrado la función de células B y monocitos/macrófagos como células presentadoras de antígenos, y la importancia de esta actividad en la proliferación de leucocitos sanguíneos periféricos y producción de anticuerpos (Vallejo y cols., 1992). En salmón del Atlántico se ha sugerido que la retención de antígenos y la activación de macrófagos en agregados de melanomacrófagos en el bazo son de vital importancia para lograr la generación de memoria inmunológica contra la furunculosis (Press y cols., 1996). Asimismo, en carpas inmunizadas con complejos inmunes preparados con gama globulina humana se indujo un mayor nivel de anticuerpos que en peces inmunizados con el antígeno libre (Secombes y Resink, 1984).

1.4.4. Receptores Fc en peces

Los estudios con patógenos en presencia de suero proporcionan evidencia funcional de la presencia de receptores en la superficie de los fagocitos de pez que interactúan con las Igs presentes en complejos bacteria-anticuerpo. En efecto, se ha probado la existencia de receptores para el dominio Fc (RFc) en la

superficie de leucocitos de tiburón nodriza (*Ginglymostoma cirratum*). El rol del dominio Fc de la Ig de tiburón en la mediación de la unión se demostró a través de la disminución considerable de ésta cuando los leucocitos eran preincubados con porciones Fc purificadas. (Haynes y cols., 1988). Un estudio del año 2003 describió la capacidad opsonizante de antisuero de conejo, al comparar la neutralización del virus de la anemia infecciosa de salmón (ISAV) por antisuero de pez y de conejo, observándose que en el caso de la línea celular de pez similar a macrófago, TO, los anticuerpos antivirales de conejo facilitaron la entrada del virus a las células, sugiriendo que los macrófagos de teleósteos podrían tener receptores Fc para inmunoglobulinas de mamífero (Joseph y cols., 2003). Este resultado se apoya en el hecho de que un homólogo del receptor Fc para IgE (FcεR1y) de mamífero se identificó en carpa (Fujiki y cols., 2000); asimismo, recientemente se identificó en bagre un RFc soluble relacionado filogenética y estructuralmente al RFc de mamíferos. Secuencias genómicas relacionadas con este receptor se encontraron en trucha y pez globo (*Spheroides nephelus*), y análisis funcionales preliminares sugieren que podría unirse a Igs de pez como una proteína soluble en el suero o como un receptor cuando se expresa en la superficie celular de ciertos leucocitos (Stafford y cols., 2006).

1.4.5. Respuesta inmune frente a *P. salmonis* e interacción *P. salmonis* – huésped

Aunque *P. salmonis* fue el primer patógeno bacteriano intracelular Gram negativo aislado de salmónidos afectados por grandes mortalidades, los mecanismos de respuesta inmune inducidos por la bacteria no se han estudiado en profundidad, limitándose principalmente al registro de mortalidades y nivel de anticuerpos después de una infección experimental o tras la inmunización con la bacteria inactivada o componentes de la misma en ensayos destinados a la evaluación de potenciales vacunas.

La reproducción experimental de piscirickettsiosis en salmones Coho infectados por diferentes vías, demostró que *P. salmonis* puede ingresar al pez a través de la piel, intestino y branquias. La piel fue el sitio de entrada más eficiente y por el que se indujo el mayor nivel de mortalidad. La infección podría iniciarse a través de la unión del patógeno a la superficie de lesiones microscópicas, presentes

frecuentemente en salmones cultivados (Smith y cols., 2004). La comparación del grado de virulencia ha permitido establecer diferencias biológicas significativas entre aislados chilenos y de otros países, que presentan una baja variabilidad genética. Ninguno de los aislados extranjeros ha demostrado ser tan virulento como el primer aislado chileno (House y cols., 1999). La disminución de la virulencia asociada a *P. salmonis* tras sucesivos pasajes de cultivo, se ha correlacionado con variaciones del patrón proteico, sugiriendo que la naturaleza patogénica de una cepa podría reflejarse en su patrón electroforético (Larenas y cols., 2006).

Mediante el análisis de microarreglo se estudió la interacción *P. salmonis*-huésped, identificando una serie de biomarcadores moleculares generados en respuesta a la exposición a *P. salmonis* en macrófagos infectados *in vitro* y tejido hematopoyético del riñón de salmones del Atlántico infectados. Ambos tejidos compartieron la disminución de la expresión de un mismo gen asociado a procesos antioxidantes, pero en macrófagos infectados aumentó la expresión de al menos otros diez genes involucrados en la respuesta al estrés oxidativo. Esto daría cuenta de una regulación diferenciada de los factores de virulencia del patógeno en diferentes tejidos del pez infectado, promoviendo su supervivencia al interior de los macrófagos a través de la protección de la integridad frente al daño oxidativo generado por mecanismos como el estallido respiratorio. Por el contrario, en el tejido renal podría contribuir al daño tisular inducido por la infección. Este resultado se reflejó en la baja expresión en riñón hematopoyético infectado, de transcritos involucrados en la respuesta inmune adaptativa. Otro gen inducido en macrófagos infectados fue el de I κ B α , inhibidor endógeno de NF- κ B, un factor nuclear sensible a las variaciones del estado redox, usualmente activado en células infectadas. Este factor de transcripción participa en la regulación de la expresión de numerosos genes involucrados en la respuesta inmune innata y adquirida. Su inhibición podría formar parte del mecanismo por el cual *P. salmonis* evade la respuesta inmune de los macrófagos permitiendo la supervivencia intracelular del patógeno (Rise y cols., 2004).

En un estudio reciente se analizaron diversas condiciones implicadas en la supervivencia de *P. salmonis* en el interior de macrófagos de salmón del Atlántico. Estas células fagocitaron a la bacteria más eficientemente que a esferas

fluorescentes. Además, se observó que macrófagos infectados con una cepa virulenta permanecían viables por más tiempo que macrófagos infectados con una cepa de baja virulencia, sugiriendo que esta última no escapó de los mecanismos de defensa al interior del macrófago. Por último, en presencia de suero policlonal de conejo, no se observó una inhibición de la entrada de *P. salmonis* a los distintos tipos celulares, mientras que al mezclar la bacteria con antisuero obtenido de peces inmunizados con el patógeno inactivado se detectó un efecto inhibitorio específico del crecimiento de la bacteria en el interior de células CHSE (Bordevik, 2006).

Los antecedentes recopilados proporcionan evidencia que apoya el desarrollo de una vacuna basada en complejos inmunes con *P. salmonis*, con el fin de mejorar la presentación antigénica de este patógeno e inducir una respuesta inmune innata que promueva una inmunidad adquirida más duradera. Además, el uso de diversos métodos inmunológicos en la monitorización del desarrollo de la respuesta inmune de salmón del Atlántico frente a vacunas experimentales, permitirá profundizar en el conocimiento de la inmunología de esta especie y a través de la correlación de diversos parámetros innatos y adquiridos, predecir desde fases tempranas la eficacia de potenciales vacunas.

2. HIPÓTESIS

Complejos inmunes formados con *Piscirickettsia salmonis* inactivada y anticuerpos policlonales anti *Piscirickettsia salmonis* inducen en salmón del Atlántico (*Salmo salar*) una respuesta inmune innata y adquirida mayor que *Piscirickettsia salmonis* inactivada libre.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General

Comparar algunos parámetros de la respuesta inmune innata y adquirida de salmón del Atlántico inducidos por complejos inmunes preparados con *P. salmonis* inactivada y anticuerpos policlonales anti *P. salmonis*, con la respuesta inducida por la bacterina libre.

3.2. Objetivos Específicos

1. Determinar proporción óptima de antígeno-anticuerpo (*P. salmonis*-anticuerpos policlonales de conejo) para preparar complejos inmunes.
2. Evaluar parámetros de respuesta inmune innata y adquirida de salmones inmunizados con complejos inmunes con *P. salmonis* inactivada y con la bacterina libre.
3. Comparar la respuesta *in vitro* de leucocitos de salmón expuestos a *P. salmonis* libre y complejada.

4. MATERIALES

4.1. Material biológico

4.1.1. Aislados bacterianos

En todos los ensayos realizados en este estudio se utilizó una cepa de *P. salmonis* denominada Huelmo, semipurificada e inactivada con formaldehído, nombrada *P. salmonis* durante el estudio. La bacterina fue proporcionada por el Depto. de Producción Biológicos de Veterquímica.

En el ensayo de aglutinación se utilizaron las siguientes bacterias: *Flavobacterium sp.*, obtenido de agua dulce de estanques en las instalaciones de la piscicultura Australis; *Pseudomonas sp.*, *Sphingomona sp.* y *Arthrobacter sp.*, provenientes de ovas de salmón; *Flavobacterium psychrophilum* y *Aeromonas hydrophyla*, aisladas de peces infectados.

Para realizar el ensayo de Lisozima se utilizó *Micrococcus lysodeikticus* ATCC 4698 liofilizado de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EEUU).

4.1.2. Animales

Para la obtención de antisuero anti *P. salmonis* se utilizaron conejos hembra de raza Neozelandesa de 1,5- 2 Kg.

Para los ensayos inmunológicos *in vitro* e *in vivo* se utilizó la especie de peces Salmón del Atlántico (*Salmo salar*) de 20- 25 g.

4.1.3. Anticuerpos

Para realizar el ensayo de ELISA se utilizó un anticuerpo monoclonal anti IgM de Trucha/Salmón producido en ratón, de Aquatic Diagnostic Ltda. (Stirling, Escocia) y un anticuerpo conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) anti IgG (molécula completa) de ratón producido en conejo, de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EEUU).

Para marcar los anticuerpos de conejo unidos a *P. salmonis* en los complejos inmunes estudiados por citometría de flujo, se utilizó un anticuerpo anti IgG (H+ L) de conejo conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) de Pierce Biotechnology (Rockford, EEUU).

4.2. Reactivos

4.2.1. Medios de cultivo y suplementos de cultivo

Para ensayar el estallido respiratorio de los leucocitos de salmón se utilizaron los siguientes medios de cultivo celular: medio L-15 de Leibovitz (L-15) y R.P.M.I. 1640 (RPMI). Para recubrir las placas para el ensayo de ELISA se ocupó poli-L-lisina, todos de GIBCO (Grand Island, NY, EEUU).

Los medios fueron suplementados con suero fetal bovino (SFB), de GIBCO (Grand Island, NY, EEUU), penicilina y estreptomina (producidos por Depto. de Producción Biológicos de Veterquímica).

4.2.3. Reactivos generales

Acido cítrico, albúmina de suero bovino (BSA), fosfato disódico (Na_2HPO_4), fosfato monosódico (NaH_2PO_4), hidróxido de potasio (KOH), Timerosal, Tris- Base, de Merck, (Darmstadt, Alemania).

Azul de nitrotetrazolio (NBT), cloruro de sodio (NaCl), heparina, 3,3',5,5'-Tetrametilbencidina (TMB), Tween 20, de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EEUU).

Azul de tripán, de GIBCO (Grand Island, NY, EEUU).

Bicarbonato de sodio (NaHCO_3), carbonato de sodio (Na_2CO_3), dimetil sulfóxido (DMSO), Metanol (MeOH), de Winkler (Santiago de Chile).

Coadyuvante oleoso no mineral (facilitado por Depto. de Producción Biológicos de Veterquímica).

Colorante homodímero de etidio-1 (EthD-1), de Molecular Probes Inc. (Eugene, OR, EEUU)

Cytodex 3 (Microcarriers), de Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Suecia).

5. MÉTODOS

5.1. Medios y condiciones de cultivo

La cepa de *P. salmonis* utilizada durante el estudio fue cultivada en monocapas de la línea celular de pez CHSE-214 en medio mínimo esencial de Eagle (MEM) sin antibiótico, suplementado con suero fetal bovino. Su crecimiento se controló por la aparición de efecto citopático (ECP). Al cabo de un período en el que se alcanzó el 80-90% de ECP, se calculó el título de la bacteria según el método de Reed y Muench (1938). Posteriormente, la bacteria se inactivó con formaldehído y fue semipurificada mediante sucesivas centrifugaciones diferenciales.

Los aislados utilizados en el ensayo de aglutinación se cultivaron en agar tripton extracto de levadura (agar TYE) a $20 \pm 1^\circ\text{C}$ por 48 h, aproximadamente. Posteriormente, las bacterias fueron inactivadas con formaldehído y mantenidas a 4°C hasta su uso.

5.2. Cuantificación de *P. salmonis* inactivada

Para revisar el título de la bacteria utilizada, se cuantificó por citometría de flujo, tiñéndola con el colorante EthD-1 y usando una suspensión de microesferas de poliestireno de $6 \mu\text{m}$ como estándar de referencia para determinar el volumen de la suspensión bacteriana analizada. El colorante empleado se une fuertemente a los ácidos nucleicos y emite fluorescencia roja, además penetra sólo en células cuya membrana ha perdido su integridad por lo que se usa para teñir específicamente células muertas.

Un volumen de 1mL de una dilución 1:100 de *P. salmonis* en PBS, se incubó con $4 \mu\text{L}$ de EthD-1 a temperatura ambiente, en oscuridad, por 20 min. Luego se agregó $2 \mu\text{L}$ de la suspensión de microesferas de concentración 10^8 microesferas/mL (200.000 microesferas) y se analizó la muestra en un citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, Calif. EEUU), equipado con un

láser de excitación de Argón con una longitud de onda de 488 nm y un montaje estándar de filtros. La adquisición y análisis de los datos se realizó con el programa CELL Quest. Utilizando una muestra de bacterias teñidas, sin agregar microesferas, se ajustó la amplificación de las señales de dispersión frontal (FSC) y lateral (SSC) de la luz ubicando a las bacterias en el centro del espacio de adquisición de datos. Los restos celulares y agregados fueron excluidos electrónicamente sobre las bases de dispersión de la luz y emisión de fluorescencia. Los parámetros del citómetro se ajustaron para obtener lecturas óptimas y se mantuvieron constantes durante el estudio.

Después de ajustar el citómetro de flujo, se analizaron las muestras experimentales (bacteria teñida más microesferas) definiendo dos regiones correspondientes a bacterias y microesferas. En cada análisis se midió la dispersión de la luz lateral versus la intensidad de fluorescencia a 520-560 nm (FL3) de los eventos celulares enmarcados en la región definida para las bacterias teñidas, adquiriéndose cada vez aproximadamente 10.000 eventos.

5.3. Determinación proporción óptima antígeno-anticuerpo

La proporción óptima de antígeno-anticuerpo para preparar complejos inmunes (CI) para estimular los leucocitos de salmón *in vitro* e *in vivo*, se determinó por citometría de flujo. Una dilución 1:100 de la suspensión de *P. salmonis* se incubó con distintas diluciones de suero de conejo anti- *P. salmonis* en PBS en un volumen final de 1 mL por 1h a 37°C y luego toda la noche a 15°C con agitación moderada. Al día siguiente se precipitó los complejos antígeno-anticuerpo centrifugando a 6.000 rpm por 8 min, se resuspendieron en 1 mL de PBS y se marcaron las porciones de antígeno y anticuerpo para su posterior análisis en el mismo equipo en que se cuantificó la bacteria. Un volumen de 0,5 mL de complejos inmunes se incubó con 4 µL de EthD-1 por 20 min a temperatura ambiente para teñir la bacteria, a continuación se incubó con 10 µL de anti-IgG de conejo conjugada con FITC (anti-IgG-FITC) diluida 1:50 por aproximadamente 30 min-1h a 4°C para marcar los anticuerpos unidos a la bacteria. La dilución del anticuerpo secundario (anti-IgG-FITC) que permitiera obtener una mayor amplificación de la señal se determinó como la mínima dilución que permitiera obtener un mayor índice de fluorescencia sobre el control negativo. El valor de la media de la intensidad de

fluorescencia verde de una dilución 1:100 de la suspensión de *P. salmonis* teñida con EthD-1 e incubada con el anticuerpo secundario conjugado con FITC en ausencia de antisuero, se utilizó como control negativo.

El valor de la media de la intensidad de fluorescencia verde de las muestras de complejos inmunes marcados se comparó con el valor medido para el control negativo, adquiriéndose cada vez aproximadamente 15.000 eventos. La dilución óptima de antisuero se definió como la dilución que produjo la mayor intensidad de fluorescencia verde comparada con la fluorescencia del control negativo.

5.4. Formulación de antígenos

P. salmonis: para inmunizar conejos se utilizó una bacterina de *P. salmonis* inactivada con formaldehído concentrada dos veces. Por otro lado, los peces se inmunizaron con una formulación preparada con *P. salmonis* inactivada con formaldehído lavada y resuspendida en PBS en una dilución 1:100, mezclada con un coadyuvante oleoso no mineral (mencionado durante el resto del estudio como coadyuvante) en una proporción antígeno: coadyuvante 3:7.

Complejos inmunes con *P. salmonis*: una dilución 1:100 de *P. salmonis* inactivada con formaldehído y una dilución 1:5.000 de antisuero policlonal de conejo, se incubó 1h a 37°C y luego toda la noche a 15°C con agitación moderada. Al día siguiente se precipitó los complejos antígeno-anticuerpo centrifugando a 6.000 rpm por 8 min resuspendiéndolos posteriormente en PBS. Los complejos inmunes obtenidos se mezclaron con coadyuvante en una proporción antígeno:coadyuvante, 3:7.

5.5. Esquemas de Inmunización

5.5.1. Inmunización de conejos

Se inoculó conejos hembra neozelandeses de 1,5-2 Kg según el esquema descrito por Sorensen y Larsen (1986), inyectando volúmenes crecientes de *P. salmonis* inactivada con formaldehído (0,2; 0,4; 0,8; 1,6; y 3,2 mL) cada cuatro días. Previo a la primera inmunización se recolectó suero pre-inmune. Una semana después de la última inoculación se extrajo sangre de los conejos para la obtención de suero. La sangre recién extraída se incubó a 37°C por 2h y posteriormente toda

la noche a 4°C. Al día siguiente, se recolectó el suero, se inactivó por 1h a 56°C en baño termoregulado y se guardó a -20° C hasta su uso.

5.5.2. Inmunización de salmones

Tres grupos de 50 peces mantenidos en agua dulce en estanques de 50 L con un sistema de recirculación a una temperatura de $16 \pm 1^\circ\text{C}$, se inmunizaron con distintas formulaciones del antígeno (descritas en “Formulación de antígenos”) vía intraperitoneal. A cada pez se le inyectó 0,2 mL de la formulación correspondiente. Los grupos y su tratamiento se indican a continuación:

Grupo 1 (G1): corresponde al grupo control, inyectado con PBS en coadyuvante (proporción PBS:coadyuvante 3:7).

Grupo 2 (G2): inmunizado con formulación de bacterina libre (*P. salmonis* diluida 1:100) en coadyuvante (proporción antígeno:coadyuvante 3:7).

Grupo 3 (G3): inmunizado con formulación de CI (preparados con *P. salmonis* diluida 1:100 y antisuero policlonal de conejo diluido 1:5.000) en coadyuvante (proporción antígeno:coadyuvante 3:7).

5.6. Estudio de la respuesta inmune innata celular

5.6.1. Preparación de suspensión de microcarriers

Los microcarriers (microsoportes) empleados en este estudio, Cytodex 3, son pequeñas esferas constituidas por una capa superficial de colágeno desnaturalizado unida covalentemente a una matriz de dextrano entrecruzado. Se incluyeron como parte de un método implementado para realizar el ensayo del estallido respiratorio. Los pocillos de las placas de cultivo se recubrieron con un volumen de microcarriers de manera tal que se formara una monocapa en el fondo con el fin de facilitar la adhesión de los leucocitos de salmón. El procedimiento se hizo según las indicaciones del fabricante, utilizando PBS libre de Ca^{2+} y Mg^{2+} (PBS). Los microcarriers secos se hidrataron en PBS (50-10 mL/g microcarriers) por al menos 3 h a temperatura ambiente. El sobrenadante se desechó y se lavaron por unos pocos minutos con PBS fresco (30-50 mL/g microcarriers). El PBS se desechó y reemplazó con PBS fresco (30-50 mL/g microcarriers) para esterilizarlos en autoclave (115°C, 15 min, 15 psi). Antes de usarlos se permitió que los microcarriers esterilizados se compactaran, se desechó el sobrenadante y se enjuagaron brevemente. Finalmente, se resuspendieron en medio de cultivo L-15

suplementado con 100 U penicilina/mL y 0,1 mg estreptomicina/mL (20-50 mL/g microcarriers), a temperatura ambiente y se transfirieron al recipiente de cultivo.

5.6.2. Aislamiento de leucocitos de la cabeza del riñón de salmón

Para obtener leucocitos del riñón anterior (RA) de salmón se siguió un protocolo basado en el descrito por Secombes (1990). El pez sacrificado con un exceso de benzocaína fue sangrado por la vena caudal. A continuación, se extrajo la cabeza del riñón bajo condiciones de esterilidad y se disgregó presionándola con una espátula contra una malla de nylon (poro de 100 μm) estéril sobre una placa petri de 5 mL, mantenida en hielo, que contenía medio cL-15 (medio L-15 suplementado con 5 U heparina/mL, 100 U penicilina/mL, 0,1 mg estreptomicina/mL, 2% SFB). La suspensión celular obtenida se utilizó directamente para ensayar el estallido respiratorio de los leucocitos.

5.6.3. Cuantificación de células

Las células de la suspensión de leucocitos de cabeza del riñón se contaron al microscopio en cámara de Neubauer por el método de exclusión de azul de tripán. Luego de mezclar 100 μL de suspensión celular con 100 μL de azul de tripán, se agregó 10 μL de la mezcla en la cámara. Inmediatamente se contaron las células viables (no teñidas).

5.6.4. Estallido respiratorio de leucocitos de salmón

Leucocitos de salmón aislados, según el protocolo descrito, se distribuyeron en duplicado en placas de cultivo celular recubiertas con microcarriers. Las placas se incubaron a 15°C. Luego de la incubación, las células se lavaron dos veces con medio RPMI y se incubaron con NBT 2 mg/mL preparado en medio RPMI a 15°C. Después de la incubación las células se lavaron con medio RPMI, se fijaron con MeOH 100 % y se lavaron dos veces con MeOH 70%. El formazán producido por la reducción del NBT se disolvió con KOH y DMSO, agitando enérgicamente el contenido de los pocillos. Finalmente, se leyó la absorbancia a 600 nm. Los resultados se expresaron como la absorbancia a 600 nm por 10^5 células.

5.6.5. Medición del estallido respiratorio de salmones inmunizados

La producción intracelular de anión superóxido (O_2^-) de leucocitos de la cabeza del riñón de salmones inmunizados con diferentes formulaciones fue evaluada siguiendo el protocolo implementado para el ensayo del estallido respiratorio en placa de 24 pocillos. El procedimiento se describe en detalle en la figura 2.

5.6.6. Estimulación de leucocitos de salmón *in vitro*

La respuesta *in vitro* a *P. salmonis* libre y complejada se comparó midiendo la producción intracelular de anión superóxido (O_2^-) de leucocitos de la cabeza del riñón de salmón en placa de 96 pocillos siguiendo el protocolo implementado para el ensayo del estallido respiratorio. Los leucocitos aislados de tres salmones de 15-20g fueron estimulados agregando volúmenes crecientes de una dilución 1:100 de *P. salmonis* y de CI preparados con la misma cantidad de *P. salmonis* y antisuero policlonal de conejo diluido 1:5.000 (proporción determinada por citometría de flujo). Los volúmenes agregados de la bacterina libre y complejada fueron: 2,5 μ L, 5 μ L y 10 μ L. Como control negativo se utilizó la lectura de absorbancia a 600 nm de células que no fueron estimuladas. El procedimiento se describe en detalle en la figura 2.

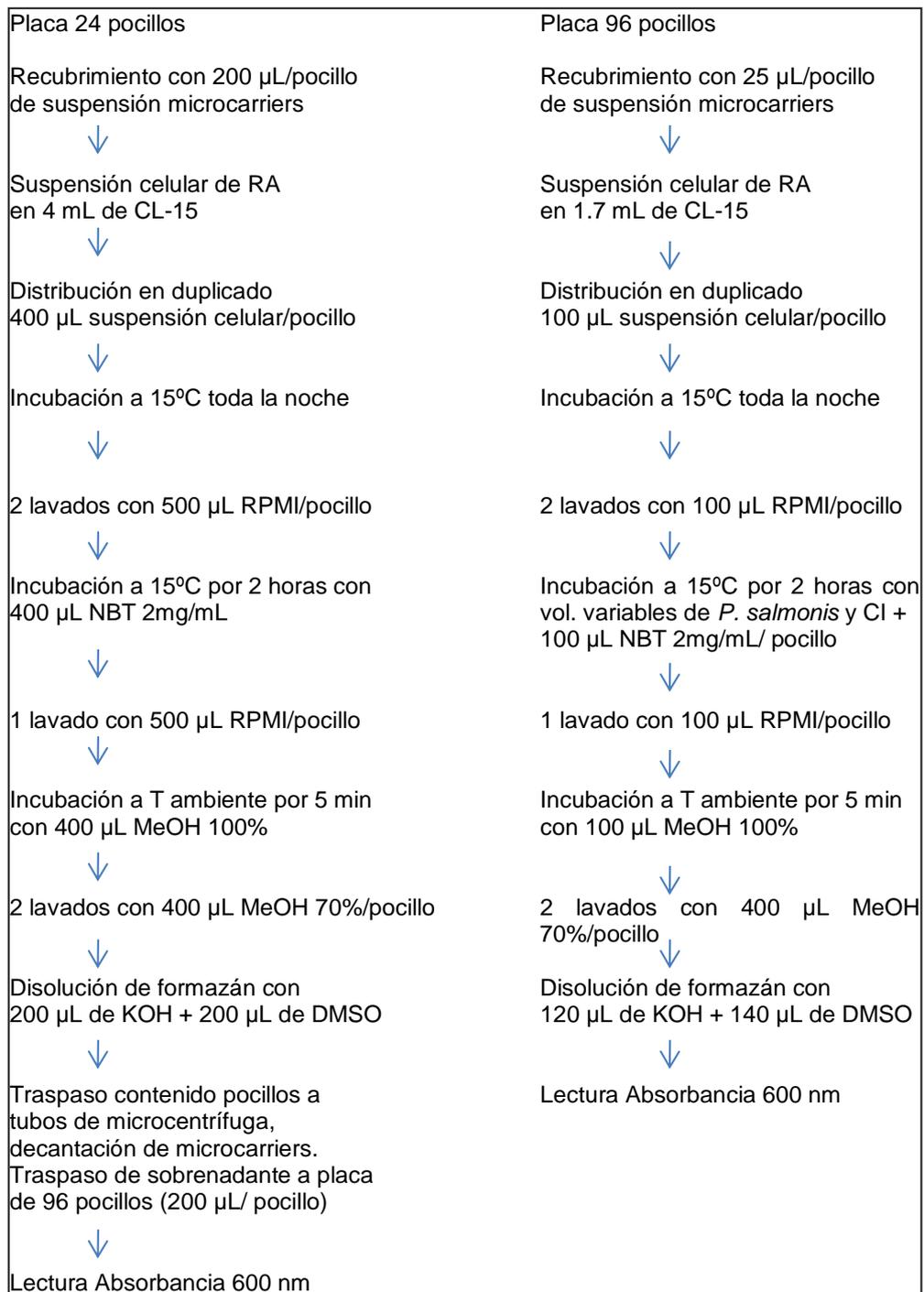


Fig. 2. Esquemas de ensayo del estallido respiratorio en placas de 24 y 96 pocillos. RA: riñón anterior.

5.7 Estudios de la respuesta inmune humoral innata y adquirida

5.7.1. Muestras de suero para ensayos de ELISA y actividad de lisozima

Previo a la inmunización se recolectó suero de peces para utilizarlo como control en los ensayos de ELISA y lisozima. Después de la inmunización se

recolectó, a intervalos de días variables, el suero de tres peces por grupo. Los sueros de peces de un mismo grupo no se mezclaron, y se mantuvieron a -20°C.

5.7.2. Ensayo de ELISA

Placas de cultivo celular de 96 pocillos se recubrieron con poli-L-lisina (5 µg/mL) en una solución tampón de carbonato-bicarbonato (100 µL/pocillo) incubándolas toda la noche a 4°C. Al día siguiente se lavó la placas con 400 µL/pocillo de una solución tampón de baja salinidad (Tris 20mM, NaCl 0,38 M, timerosal 0,01%, Tween 20 0,05%) y se activaron con una suspensión de *P. salmonis* inactivada con formaldehído, preparada en PBS en una dilución tal que se agregó aproximadamente 10⁷ bacterias/ pocillo (100 µL/pocillo), incubando toda la noche a 4°C. Al día siguiente las placas se lavaron 3 veces con la solución tampón de baja salinidad, y se bloquearon con BSA 1% en PBS (200 µL/pocillo) durante 3 h a 37°C, lavándose posteriormente 5 veces con la solución tampón de baja salinidad. Luego, se agregaron los sueros de peces no inmune e inmune, los cuales se compararon a una dilución única (1:20) en PBS. Las placas se incubaron a 15°C por 3h, se lavaron 5 veces con una solución tampón de alta salinidad (Tris 20mM, NaCl 0,5M, timerosal 0,01%, Tween 20 0,1%), se incubaron a 15°C por 1h con un anticuerpo monoclonal (isotipo IgG 1) anti-IgM de salmón diluído 1:37,5 en BSA 1% en PBS y se lavaron nuevamente 5 veces con la solución tampón de alta salinidad. El anticuerpo monoclonal anti-IgM de salmón fue reconocido incubando a 15° C por 1h con un tercer anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa diluído 1:1.000 en tampón de conjugado (BSA 1% en solución tampón de baja salinidad). Luego, se lavaron las placas 5 veces con la solución tampón de alta salinidad. Las placas se revelaron incubándolas con una solución de TMB (100 µL/pocillo) por 10 min a 15°C, la reacción se detuvo con H₂SO₄ 2 M (50 µl/pocillo). Finalmente, se leyó la absorbancia a 492 nm en un espectrofotómetro Multiskan MS (Labsystems).

5.7.3. Ensayo de la lisozima

La actividad de la lisozima se midió de acuerdo al protocolo desarrollado en el Instituto de Acuicultura de la Universidad de Stirling, Escocia (comunicación personal Dra. Kim D. Thompson), usando un ensayo turbidimétrico en placa de 96 pocillos en que se ocupó como sustrato 0,2 mg/mL de *Micrococcus lysodeikticus*

en solución tampón sodio fosfato 0,04 M (pH 5,8). Diez μL de suero de pez se agregaron sobre 190 μL de suspensión bacteriana y se midió la disminución de la absorbancia a 450 nm después de 1 min y 5 min de incubación a 22°C. Una unidad de actividad de lisozima se definió como la reducción de 0,001 en absorbancia por minuto.

5.7.4. Ensayo de aglutinación

Con el fin de comparar la reactividad cruzada de los sueros con varios microorganismos simultáneamente, el ensayo de aglutinación se realizó utilizando una placa de vidrio para aglutinación. En cada cuadro se agregó un volumen de antisuero de pez diluido 1:10. Luego se agregó un volumen igual de suspensión bacteriana y se mezcló con movimientos circulares. La visualización del ensayo se realizó a contraluz sobre una superficie oscura. Se asignó una cruz (+) cuando se observó una aglutinación rápida y definida, un signo más/menos (\pm) para una aglutinación débil y tardía, y un signo menos (-) cuando no se observó reacción. La unión inespecífica o auto-aglutinación se controló mezclando por separado los sueros y suspensiones bacterianas con PBS.

5.8. Análisis estadístico

Los gráficos representan los datos de uno de al menos dos experimentos independientes.

Para determinar la significancia estadística de las diferencias entre los promedios de los valores entre los distintos grupos comparados y dentro de cada grupo, los datos de los ensayos realizados con los peces incluidos en la prueba de inmunización se analizaron mediante el test t de student no pareado de dos colas. Las diferencias se consideraron significativas cuando $P < 0,01$ y $P < 0,05$.

Los datos del ensayo del estallido respiratorio en salmones estimulados *in vitro* se analizaron mediante el test t de student pareado de dos colas para determinar la significancia estadística de los promedios de los valores comparados con los valores del control. Las diferencias se consideraron significativas cuando $P < 0,05$.

6. RESULTADOS

6.1. Cuantificación de *P. salmonis* por citometría de flujo

El título de la bacteria utilizada para realizar los estudios se revisó cuantificándola por citometría de flujo.

Las propiedades de dispersión de la luz y emisión de fluorescencia de la bacteria teñida, se utilizaron para definir una región de adquisición para las bacterias. Debido a que las bacterias fueron inactivadas, su perfil a lo largo del eje FSC fue muy bajo, por lo que su región de adquisición se definió a lo largo del eje SSC. Además, se ha demostrado que en el equipo utilizado, las partículas pequeñas (menores a 1 μm) son mejor resueltas sobre las bases de la dispersión lateral de la luz (SSC) (Martz, 2000; www.bio.umass.edu/micro/immunology/facs542/facsprin.htm), lo cual resulta más apropiado para *P. salmonis*, cuyo rango de tamaño varía entre 0,5 y 1,5 μm . Una segunda ventana de adquisición fue definida para las microesferas de manera que se distinguieran fácilmente de las bacterias y otros eventos. De esta forma, las bacterias presentes en las muestras experimentales (*P. salmonis* teñida más microesferas estándar de 6 μm) se identificaron por su complejidad y emisión de fluorescencia roja. Bajo estos parámetros fueron incluidas partículas marcadas con un perfil elevado de SSC, las cuales se consideraron como células muertas antes de ser inactivadas (Figura 3).

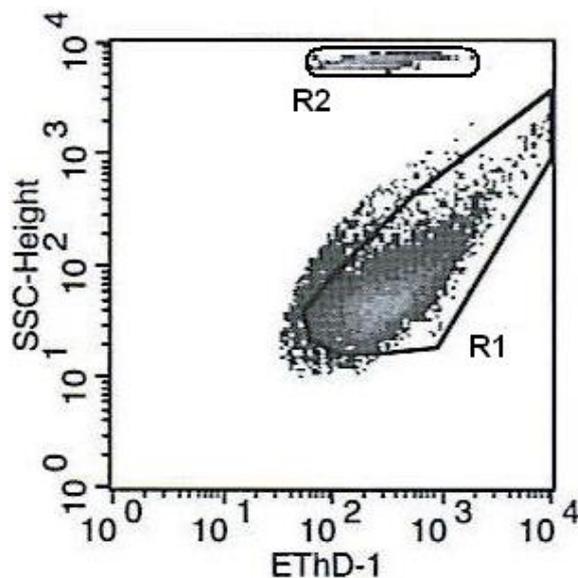


Fig. 3. Cuantificación de *P. salmonis* por citometría de flujo. En este gráfico de SSC versus fluorescencia roja, las señales enmarcadas en la región R1 representan a la bacteria teñida con el colorante EThD-1; las señales enmarcadas en la región R2 representan a las microesferas, usadas como estándar para estimar el volumen de la muestra.

La concentración de bacterias en las muestras se calculó a partir de la siguiente fórmula (basado en protocolo de *CountBright™ Absolute Counting Beads *for flow cytometry** de Molecular Probes™ Invitrogen)

$$\frac{A}{B} \times \frac{C}{D} = \text{células/ mL de muestra, donde:}$$

A: número de eventos correspondientes a bacterias

B: número de eventos correspondientes a microesferas

C: número de microesferas agregado a la muestra (en este caso 200.000)

D: volumen de muestra (en este caso 1 mL)

Al multiplicar el valor obtenido por el factor de dilución correspondiente, en este caso 100, se obtuvo la concentración de *P. salmonis* en la muestra original. En dos cuantificaciones realizadas por separado se determinó un total de $8,5 \times 10^7$ bacterias/mL y $6,8 \times 10^7$ bacterias/mL, promediando alrededor de $7,5 \times 10^7$ bacterias/mL. Este valor resultó ser aproximadamente un orden de magnitud menor que el título informado para la bacteria facilitada, correspondiente a $1,316 \times 10^9$ TCID₅₀/mL (Dosis Infecciosa del 50% del Cultivo Celular), el cual se determinó según el método de Reed y Muench.

Los ensayos del estudio se realizaron trabajando con el promedio de los valores de concentración de *P. salmonis* determinados por citometría de flujo.

6.2. Determinación de proporción óptima antígeno-anticuerpo para formación de complejos inmunes con *P. salmonis*

La proporción óptima de antígeno-anticuerpo para la formación de complejos inmunes con *P. salmonis* se determinó mediante citometría de flujo.

La formación de CI se monitoreó a través del desplazamiento de la población doblemente marcada en el eje de las abscisas (Figura 4) el cual se consideró proporcional a la cantidad de complejos formados, puesto que refleja la unión del anticuerpo conjugado a FITC a anticuerpos asociados a la bacteria. Para determinar la dilución óptima de antisuero necesaria para formar CI con la cantidad de bacteria utilizada, se midió el valor del porcentaje de la media de la intensidad de la fluorescencia verde de cada muestra y se calculó el índice de fluorescencia correspondiente: $\frac{\% \text{ fluorescencia muestra experimental "x"}}{\% \text{ fluorescencia control negativo}}$

% fluorescencia control negativo.

Este valor fue aumentando conforme al aumento de la dilución del antisuero, obteniéndose el mayor índice de fluorescencia para una dilución de antisuero 1:5.000. En la siguiente dilución de antisuero, 1:8.000, se observó una disminución de la fluorescencia indicando una cantidad de anticuerpo inferior a la necesaria para la formación de CI (Figuras 5 y 6).

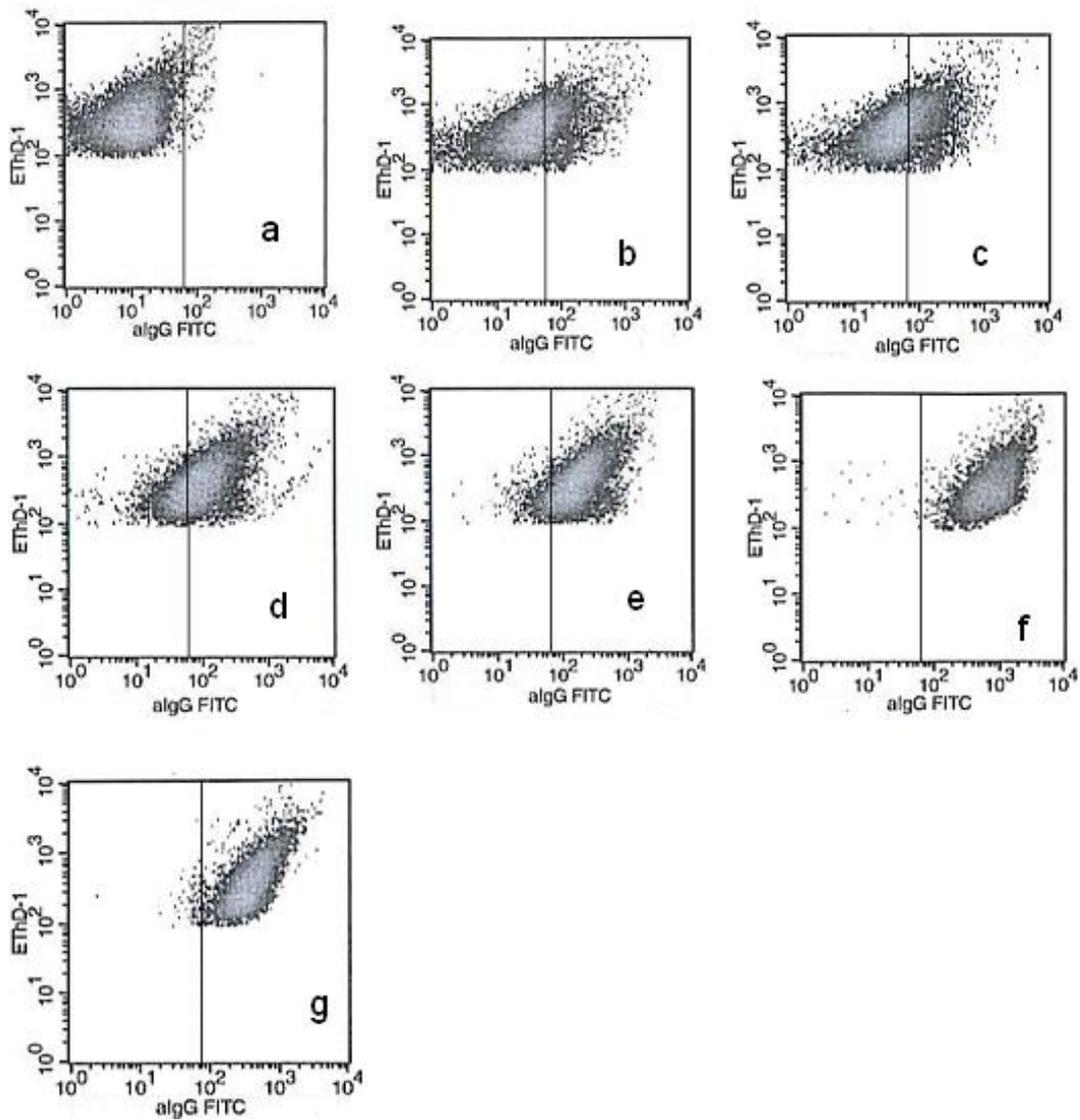


Fig. 4. Citometría de flujo de complejos inmunes con *P. salmonis*. Los gráficos (a-g) muestran el análisis de fluorescencia roja (eje y) versus verde (eje x) de CI preparados con una dilución fija de *P. salmonis* y diluciones crecientes de antisuero. La fluorescencia verde emitida por la bacteria teñida con EthD-1 sin antisuero e incubada con anti- IgG - FITC se usó como control negativo (a). Las diluciones de antisuero se indican a continuación: (b) antisuero 1:200, (c) antisuero 1:500, (d) antisuero 1:1.000, (e) antisuero 1:2.000, (f) antisuero 1:5.000, (g) antisuero 1:8.000. El desplazamiento de los eventos en el eje de las abscisas refleja la formación de CI.

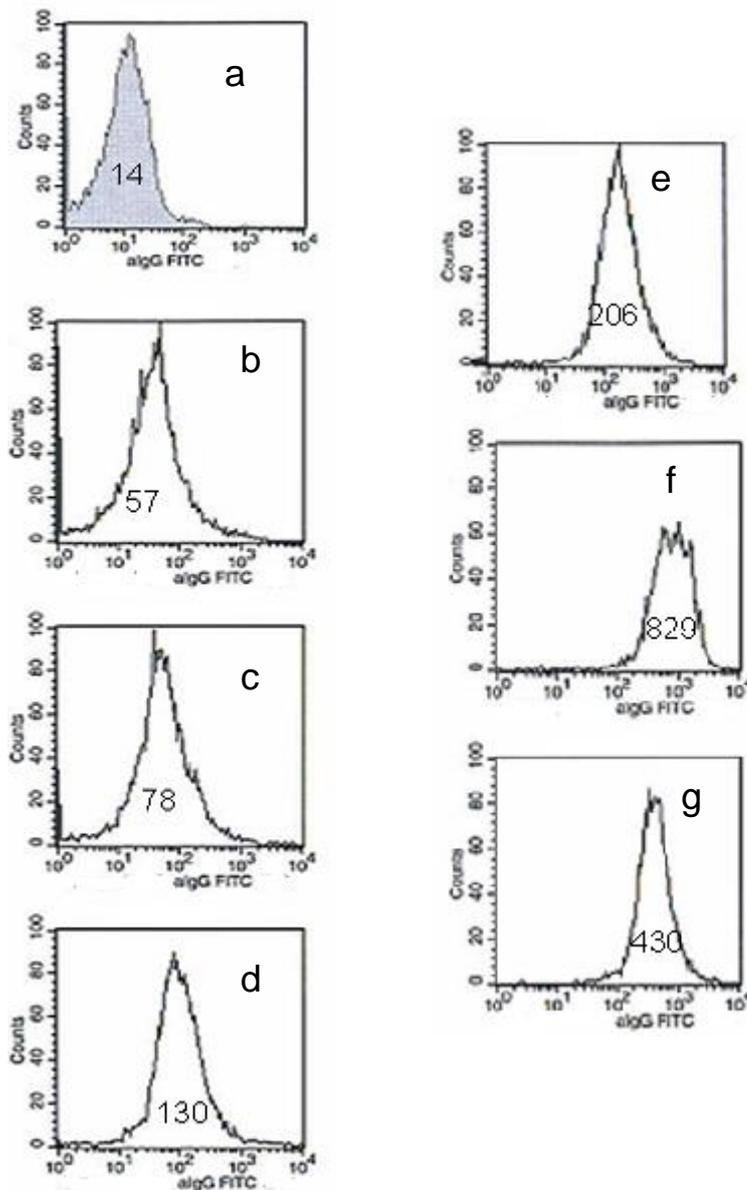


Fig. 5. Determinación de la dilución óptima de antisuero para formar complejos inmunes con *P.salmonis*. Los gráficos (b)-(g) corresponden a los histogramas de frecuencia de fluorescencia verde de CI preparados con una dilución fija de *P. salmonis* y diluciones crecientes de antisuero policlonal de conejo. El histograma (a) corresponde al control negativo. En el interior de cada histograma se indica el valor del porcentaje de la media de la intensidad de la fluorescencia verde. El mayor porcentaje de fluorescencia corresponde a la dilución óptima de antisuero necesaria para formar los CI.

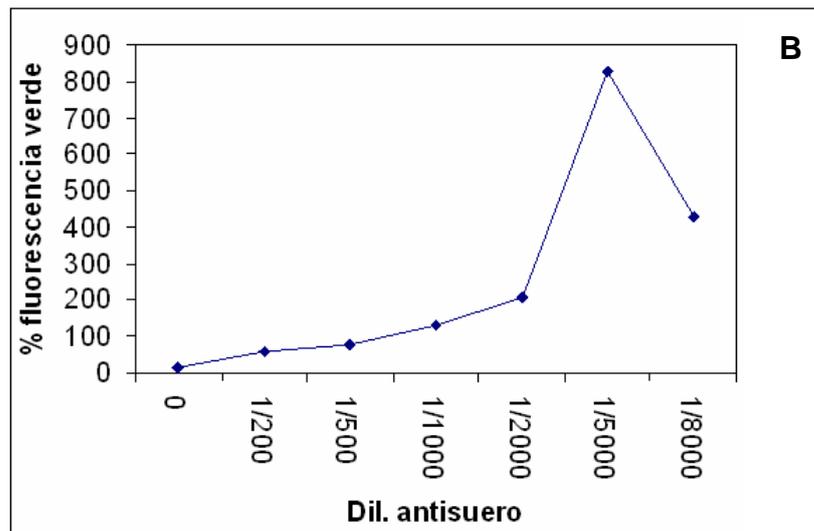
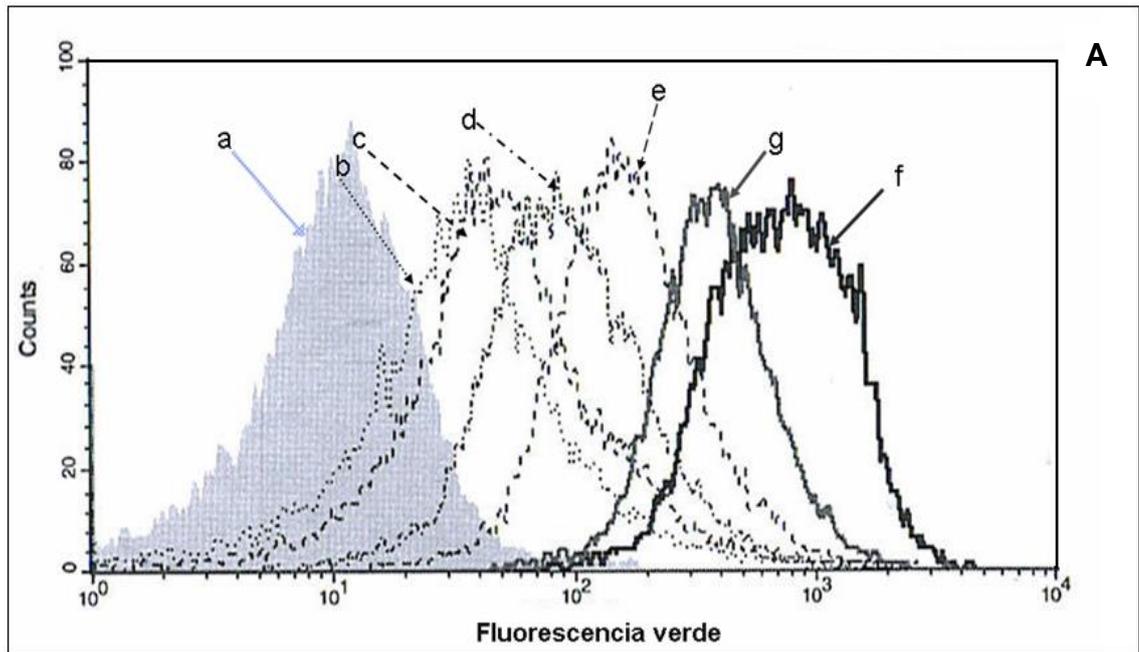


Fig. 6. Curva de precipitación de complejos inmunes con *P. salmonis*.

(A) La superposición de los histogramas muestra el progreso de la formación de CI a partir del control negativo (a) que presenta la menor intensidad relativa de fluorescencia verde, hasta la dilución óptima de antisuero (f) que registró el valor más alto. Diluciones menores y mayores a ésta no fueron suficientes para complejar la cantidad de bacteria utilizada. (B) Con los valores de los porcentajes de la intensidad relativa de la fluorescencia verde se construyó una curva de precipitina que muestra el comportamiento típico desde una cantidad excesiva de anticuerpo (dil. 1:200) hasta una cantidad insuficiente de los mismos (dil 1:8.000).

6.3. Evaluación de la respuesta inmune innata de salmones del Atlántico inmunizados con *P. salmonis* libre y complejada

6.3.1. Medición del estallido respiratorio

Uno de los principales objetivos de este trabajo fue la evaluación de algunos parámetros de la inmunidad innata en salmones inmunizados con dos formulaciones elaboradas con *P. salmonis* libre y formando parte de CI. Los leucocitos fagocíticos de los peces constituyen la primera línea de defensa contra los patógenos microbianos invasores, por esto, el estallido respiratorio de los leucocitos es un ensayo que se emplea comúnmente para evaluar el efecto de diversas sustancias y condiciones sobre la inmunidad innata de los peces.

Tras determinar la proporción óptima antígeno:anticuerpo para preparar los CI con *P. salmonis*, se comparó la respuesta inmune celular innata de salmones inmunizados con dos formulaciones elaboradas con *P. salmonis* libre y formando parte de CI, midiendo la producción intracelular basal (sin agregar agentes inductores de la respuesta) del anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) en los leucocitos aislados del riñón anterior de los peces de los grupos incluidos en el ensayo de inmunización, mediante un ensayo colorimétrico en el que se mide espectrofotométricamente el producto formazán de color azul originado por la reducción del compuesto azul de nitrotetrazolio (NBT). Para realizar este ensayo se implementó un método que incluyó el uso de microcarriers para facilitar la adhesión de los leucocitos, además, no se incluyó una etapa de purificación de la suspensión celular para no descartar el aporte de otras poblaciones celulares con potenciales propiedades fagocíticas que pudieran encontrarse en el riñón anterior, pero se previno la contaminación con glóbulos rojos sangrando previamente de forma exhaustiva a los peces y controlando luego la suspensión celular por microscopía.

Las formulaciones utilizadas se prepararon en un coadyuvante oleoso mineral, con el cual se combinó también el PBS inyectado al grupo control. Los coadyuvantes son sustancias inmunomoduladoras que se incluyen habitualmente en las formulaciones de vacunas para peces ya que poseen propiedades que potencian la inmunogenicidad de las mismas y la respuesta de los animales durante la inmunización experimental (Anderson, 1997). Entre los días 6 y 21 post-inmunización (p.i.) se midió el estallido respiratorio de los leucocitos de tres peces por grupo en forma individual. Aunque no se siguió la respuesta de peces no

inmunizados, el día 0 se midió la actividad del estallido respiratorio de salmones escogidos al azar entre los tres grupos previo a ser inyectados con las formulaciones probadas. Esta medición se realizó con el fin de confirmar el posible efecto estimulante de las formulaciones (Figura 7).

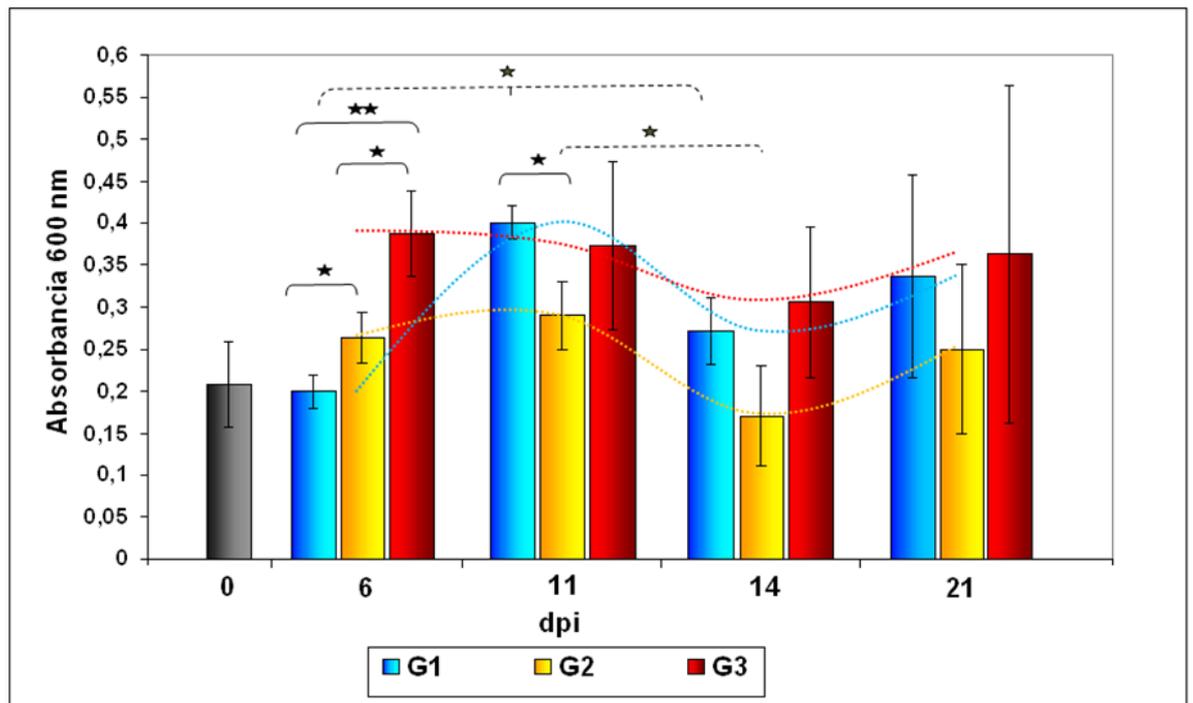


Fig. 7. Reducción del NBT en macrófagos de la cabeza del riñón de salmones inmunizados con *P. salmonis* libre y complejada. La producción intracelular basal de anión O_2^- de leucocitos del riñón anterior de salmones inmunizados con *P. salmonis* libre (G2) y formando parte de CI (G3) fue comparada a los 6, 11, 14 y 21 días post-inmunización (dpi) midiendo la reducción de NBT. Los resultados se muestran como el promedio \pm ES de la absorbancia a 600 nm medida en duplicado para tres peces por grupo cada día. El grupo control (G1) corresponde a los peces inyectados sólo con PBS en coadyuvante. El día 0 se midió la actividad del estallido respiratorio en peces seleccionados al azar antes de iniciar el ensayo de inmunización. Los valores de grupos diferentes agrupados entre corchetes muestran diferencias significativas. Los valores significativamente diferentes dentro de un grupo se agruparon entre corchetes segmentados. ** ($P < 0,01$), * ($P < 0,05$).

Al día 6 p.i. se observó un aumento significativo del estallido respiratorio en los peces inmunizados con CI (G3) comparado tanto con el grupo control ($P < 0,01$) como con el grupo inmunizado con la bacterina libre ($P < 0,05$). Hasta el término del ensayo, la respuesta del grupo 3 se mantuvo alta, y el leve descenso registrado el día 14 p.i. no fue significativo.

El grupo control (G1) mostró una baja actividad del estallido respiratorio el día 6 p.i., idéntica a la detectada en peces no inmunizados (día 0). El día 11 p.i. alcanzó su mayor nivel de respuesta, siendo significativamente superior a la actividad medida los días 6 y 14 p.i. Además, a partir de este día la respuesta fue similar a la del grupo 3.

En el grupo inmunizado con la bacterina sin complejar (G2) se observó un incremento significativo del estallido respiratorio ($P < 0,05$) comparado con el del grupo control sólo el día 6 p.i. mostrando una tendencia a la disminución de la respuesta, la cual se distinguió principalmente el día 11 p.i. donde la respuesta de este grupo fue significativamente inferior a la del grupo control ($P < 0,05$).

Al día 14 p.i. el grupo control sufrió, al igual que el grupo 2, un descenso importante en su respuesta, sin embargo los niveles medidos no fueron significativamente diferentes al nivel del grupo 3, aunque cabe señalar que la respuesta del grupo 2 fue similar a la registrada en peces no inmunizados (día 0).

Al término del ensayo el nivel de respuesta de los tres grupos fue comparable al medido el día 11 p.i., destacándose el nivel sostenido apreciado en el grupo inmunizado con CI.

6.3.2. Medición de la actividad de la lisozima

La inmunidad innata humoral de los peces incluidos en el ensayo de inmunización se estudió a través de la medición de la actividad de la lisozima. Entre los días 6 y 21 p.i., se midió la actividad de la lisozima utilizando el suero de los peces empleados en el ensayo del estallido respiratorio. Al igual que en el ensayo del estallido respiratorio, en el día 0 se midió la actividad de la lisozima en salmones escogidos al azar entre los tres grupos previo a ser inyectados con las formulaciones probadas (Figura 8).

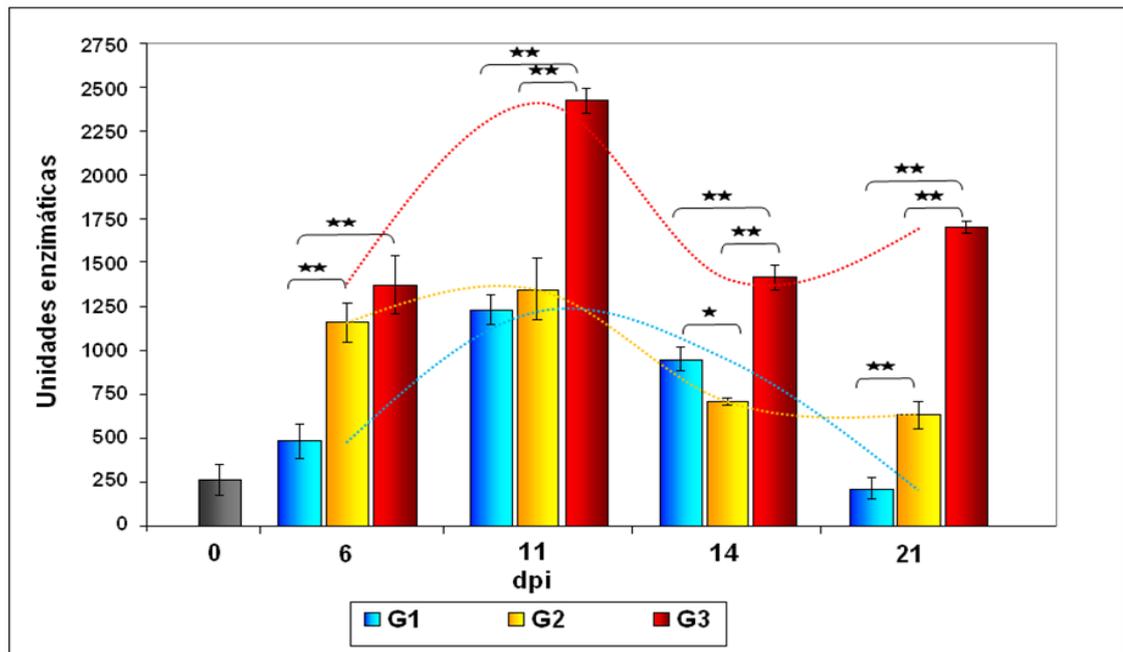


Fig. 8. Efecto de la inmunización con formulaciones con *P. salmonis* en la actividad de la lisozima de salmones. El suero de los peces empleados en el ensayo del estallido respiratorio se utilizó para medir la actividad de la lisozima presente en el suero. Los resultados se muestran como el promedio \pm ES de las unidades enzimáticas calculadas para mediciones en triplicado de los sueros de los peces ensayados individualmente. El día 0 se midió la actividad de la lisozima en salmones escogidos al azar previo a la inmunización. Los valores de grupos diferentes agrupados entre corchetes presentan diferencias significativas, ** ($P < 0,01$), * ($P < 0,05$)

Tabla 1. Diferencias estadísticas en la actividad de lisozima medida en los grupos inmunizados y control, analizados individualmente

Grupo 1					
d.p.i.		6	11	14	21
6			**	**	*
11				*	**
14					**
Grupo 2					
d.p.i.		6	11	14	21
6			-	**	*
11				**	**
14					-
Grupo 3					
d.p.i.		6	11	14	21
6			**	-	-
11				**	**
14					*

** ($P < 0,01$), * ($P < 0,05$), d.p.i.: días post-inmunización, G1: grupo control, G2: grupo inmunizado con bacterina libre, G3: grupo inmunizado con CI.

En el día 6 p.i. ambos grupos inmunizados con formulaciones de *P. salmonis* (G2 y G3), alcanzaron una actividad de la lisozima semejante, la cual fue significativamente mayor ($P < 0,01$) que la del grupo control. El grupo inmunizado con CI alcanzó un valor máximo el día 11 p.i., significativamente superior a los valores medidos en los otros días, mientras que el día 14 p.i., la actividad del grupo disminuyó hasta un nivel idéntico al registrado en el día 6 p.i.. La respuesta del grupo aumentó nuevamente el día 21 p.i., pero de manera mucho menos sobresaliente que el día 11 p.i. (tabla 1) A partir del día 11 p.i. la actividad del grupo 3 se mantuvo hasta el término del ensayo en un nivel significativamente mayor que la actividad del grupo control y del grupo inmunizado con la bacterina sin complejar ($P < 0,01$).

Entre los días 6 y 11 p.i., no se observaron diferencias significativas en la actividad de la lisozima del grupo inmunizado con la bacterina libre. En el día 14 p.i., el nivel de enzima sufrió un descenso considerable, con un valor significativamente inferior al medido en los días previos, que se mantuvo constante hasta el término del ensayo (tabla 1). Cabe señalar que el nivel de lisozima medido en el día 11 p.i. fue similar al del grupo control, y el día 14 p.i. fue significativamente menor al nivel de este grupo ($P < 0,05$).

Al inicio del ensayo (día 6 p.i.), la respuesta del grupo control fue similar a la de los peces evaluados el día 0 (previo a la inmunización). La respuesta alcanzó su máximo nivel en el día 11 p.i.. En las mediciones posteriores, la actividad de la lisozima en este grupo fue disminuyendo, hasta alcanzar en el día 21 un nivel idéntico al de los peces analizados previo a la inmunización.

Resumiendo, la actividad de la lisozima inducida por los complejos inmunes fue notablemente superior a la actividad inducida por la bacterina libre, la cual tendió a disminuir en el tiempo. Por su parte, la actividad medida en los peces inyectados con PBS en coadyuvante fue significativamente inferior en comparación con la respuesta medida con complejos inmunes, sin embargo alcanzó niveles similares a los registrados para la bacterina libre e incluso llegó a superarlos.

6.4. Evaluación de la respuesta inmune humoral adaptativa

6.4.1. Medición de la producción de anticuerpos

El desarrollo de la respuesta inmune humoral adquirida en los peces incluidos en el ensayo de inmunización se evaluó mediante el ensayo de ELISA. Los sueros de los diferentes grupos se testearon entre el día 36 y 79 post-inmunización (p.i.) frente a la misma bacterina utilizada en la preparación de las formulaciones inyectadas. Las lecturas obtenidas se consideraron positivas a una absorbancia mayor o igual a 0,2 después de sustraer el valor promedio de muestras de salmones no inmunizados. Los resultados se analizaron mediante la comparación del nivel de anticuerpos dentro de un grupo y comparaciones entre los diferentes grupos (Figura 9).

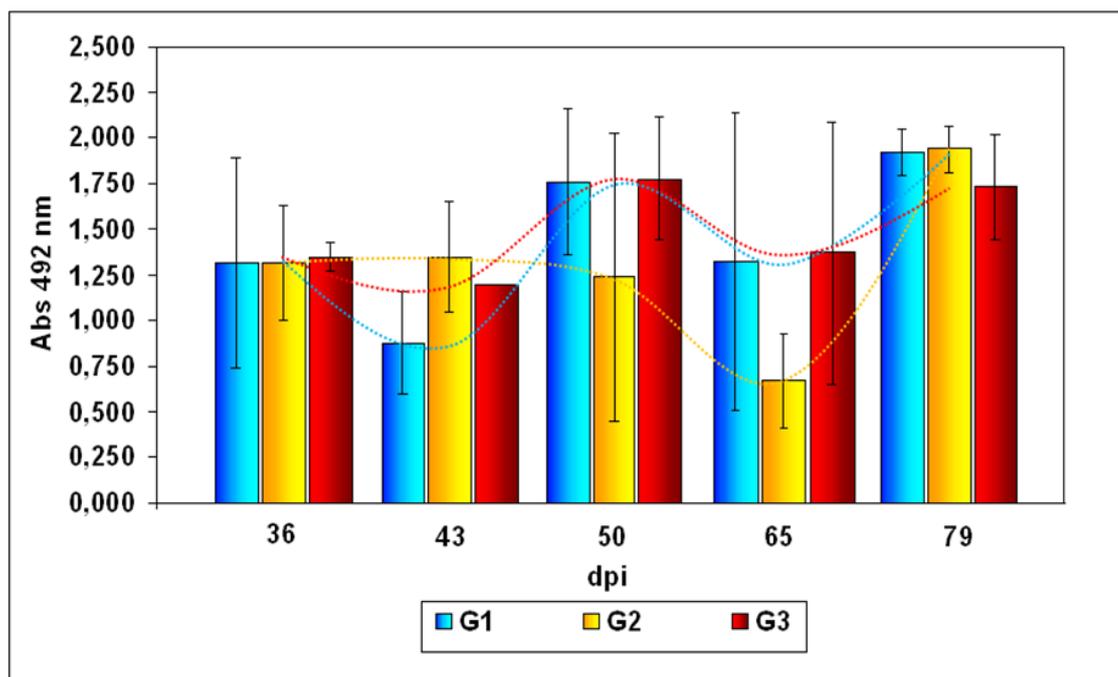


Fig. 9. Niveles de anticuerpos en salmones incluidos en el ensayo de inmunización. A partir del día 36 p.i. se comparó la respuesta inmune humoral adquirida de salmones inmunizados con *P. salmonis* libre (G2) y complejada (G3), y del grupo control correspondiente a peces inyectados con PBS en adyuvante (G1), a través de la medición de la producción de anticuerpos detectados mediante el ensayo de ELISA. Los valores corresponden al promedio de la absorbancia a 492 nm \pm ES de los sueros de tres peces por grupo probados individualmente a una dilución 1:20 frente a *P. salmonis*.

Tabla 2. Diferencias estadísticas en el nivel de anticuerpos medido en los grupos inmunizados y control, analizados individualmente

Grupo 1						
d.p.i.	36	43	50	65	79	
36		-	-	-	-	
43			*	-	-	**
50				-	-	
65						-
Grupo 2						
d.p.i.	36	43	50	65	79	
36		-	-	*	*	
43			-	*	*	
50				-	-	
65						**
Grupo 3						
d.p.i.	36	43	50	65	79	
36		-	*	-	-	
43			*	*	-	
50				-	-	
65						-

** ($P < 0,01$), * ($P < 0,05$), d.p.i.: días post-inmunización, G1: grupo control, G2: grupo inmunizado con bacterina libre, G3: grupo inmunizado con CI.

En el día 36 p.i. no se observaron diferencias entre los grupos, condición que se mantuvo hasta el día 43 p.i. En el día 50 p.i. se observó un incremento significativo del nivel de anticuerpos dentro de los grupos 1 y 3 (tabla 2), sin embargo este incremento no fue significativo respecto al grupo 2. A partir de este día, el nivel de anticuerpos de los grupos 1 y 3 se mantuvo constante hasta el término del ensayo, con valores semejantes entre sí.

Por su parte, el grupo 2 sostuvo un nivel de anticuerpos equivalente entre los días 36 y 50 p.i., que luego disminuyó significativamente en el día 65 p.i., en comparación con los días 36 y 43 p.i. (tabla 2). En el día 79 p.i. el nivel de anticuerpos de este grupo aumentó nuevamente y alcanzó valores similares a los de los grupos 1 y 3.

En síntesis, los niveles de anticuerpos medidos tanto en los peces inmunizados con CI como en el grupo control fueron prácticamente idénticos y pese a que no se diferenciaron significativamente del grupo inmunizado con la bacterina libre, mostraron una tendencia a persistir en el tiempo. La producción de

anticuerpos frente a la bacterina libre, en cambio, mostró una inclinación hacia la disminución de la respuesta inmune humoral adaptativa.

6.4.2. Ensayo de aglutinación

Debido a los resultados obtenidos en el ensayo de ELISA, donde se observó un considerable nivel de producción de anticuerpos en el grupo control, similar al del grupo inmunizado con complejos inmunes, a través del ensayo de aglutinación se evaluó la reactividad cruzada de los sueros de los grupos incluidos en la prueba de inmunización frente a bacterias aisladas de diversas fuentes: *Flavobacterium* sp., obtenido de agua dulce de estanques en las instalaciones de la piscicultura Australis; *Pseudomonas* sp., *Sphingomona* sp. y *Arthrobacter* sp., aisladas de ovas de salmón; *Flavobacterium psychrophilum* y *Aeromonas hydrophyla*, aisladas de peces infectados.

Para realizar el ensayo se utilizaron los sueros de dos peces por grupo, recolectados en los días 0 (suero no inmune), 65 y 79 p.i. Los resultados del ensayo se resumen en la tabla 4. Ningún suero analizado reaccionó con *Flavobacterium* sp., *Sphingomona* sp. y *Aeromonas hydrophyla*. Con los sueros de todos los grupos incluidos en el ensayo de inmunización se detectó reacción cruzada con *Arthrobacter* sp. y *Flavobacterium psychrophilum*. En los sueros no inmunes (NI) se observaron diferentes grados de aglutinación frente a estos antígenos, siendo el más pronunciado con *Arthrobacter* sp., mientras que con *Flavobacterium psychrophilum* se observó una reacción débil. Frente a *P. salmonis* ambos sueros reaccionaron débilmente, en tanto que con los sueros de los grupos inmunizados con la bacterina libre y complejada, así como con el grupo control, se observó una reacción positiva. Las reacciones de autoaglutinación fueron descartadas enfrentando las muestras bacterianas a PBS, con el cual no se produjo reacción alguna.

TABLA 3: Ensayo de aglutinación de sueros de salmones inmunizados con *P. salmonis* libre y complejada

	Día 65 p.i.			Día 79 p.i			Día 0
	G1	G2	G3	G1	G2	G3	NI
<i>Pseudomonas sp.</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>Flavobacterium sp.</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>Arthrobacter sp</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>Sphingomona sp.</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>Flavobacterium psychrophilum</i>	+	+	+	+	+	+	±
<i>Aeromonas hydrophyla</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. salmonis</i>	+	+	+	+	+	+	±

+: aglutinación positiva, ±: aglutinación débil, -: aglutinación negativa, p.i.: post-inmunización, G1: grupo control, G2: grupo inmunizado con bacterina libre, G3: grupo inmunizado con CI, NI: suero de peces no inmunizados.

6.5. Estallido respiratorio de leucocitos de salmón del Atlántico estimulados *in vitro* con *P. salmonis* libre y complejada

Aunque con el ensayo del estallido respiratorio implementado utilizando placas de 24 pocillos se logró medir la activación de los leucocitos de salmón del Atlántico estimulados *in vivo* a través de la inmunización con formulaciones de *P. salmonis*, en este estudio se comparó también la producción intracelular del anión superóxido (O_2^-) en leucocitos aislados del riñón anterior de salmones estimulados *in vitro* con *P. salmonis* libre y complejada. Este ensayo se realizó en placa de 96 pocillos e incluyó además otras variaciones (detalladas en la sección de métodos), con el fin de optimizarlo en términos de materiales y tiempo empleado.

De acuerdo a los resultados obtenidos, en comparación con el grupo control, no se determinaron diferencias significativas entre los tratamientos con la bacterina libre o complejada. Sin embargo, en cada punto de comparación el nivel de respuesta frente a la bacterina libre fue ligeramente superior tanto al del grupo control como frente a los CI. La activación fue dependiente de la dosis,

registrándose el mayor nivel de activación cuando se agregaron 5 μL , tanto de bacterina libre como complejada, mientras que tras agregar volúmenes inferiores (2,5 μL) o superiores a éste (10 μL), el nivel de respuesta medido fue menor para cada tratamiento (Figura 10).

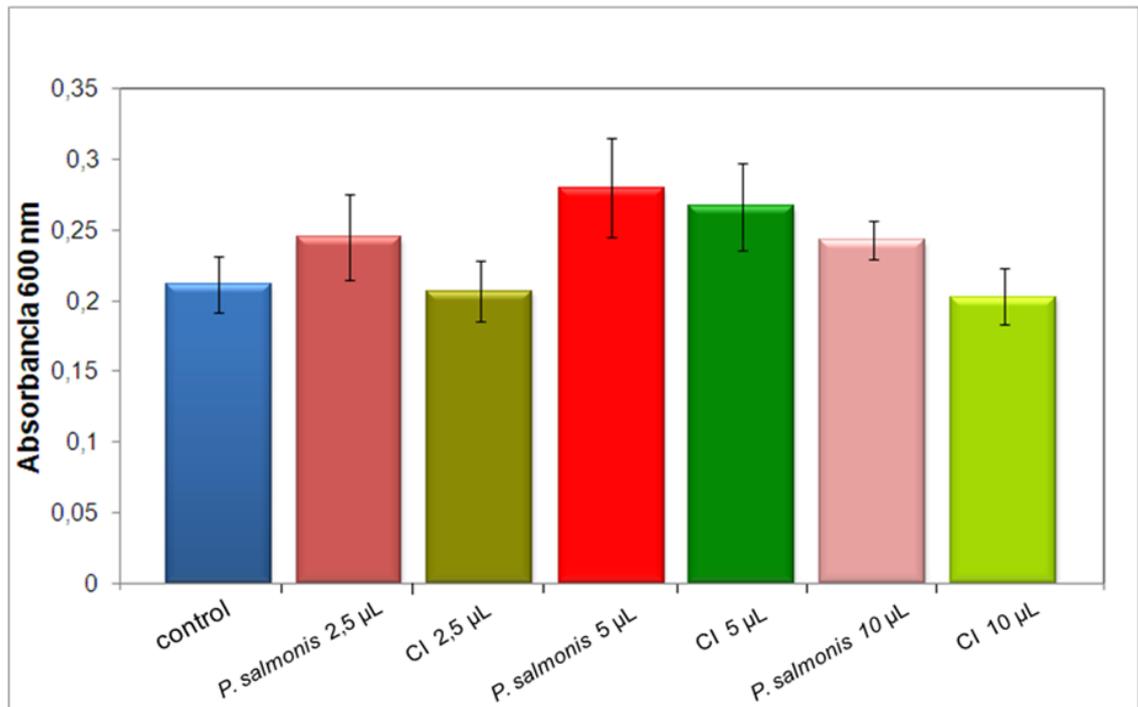


Fig. 10. Reducción del NBT por leucocitos de salmón del Atlántico estimulados in vitro con *P. salmonis* libre y complejada. La producción intracelular de anión superóxido (O_2^-) en leucocitos del riñón de salmones del Atlántico fue comparada después de la estimulación con volúmenes crecientes de la bacterina libre diluida 1:100 (*P. salmonis*) o con complejos inmunes preparados con una dilución 1:100 de la bacterina y una dilución 1:5.000 de antisuero policlonal de conejo (CI). Los resultados se muestran como el promedio \pm ES de la absorbancia a 600 nm medida en duplicado para tres peces sometidos a los distintos tratamientos. El grupo control corresponde a células no estimuladas.

7. DISCUSIÓN

Al igual que en otros países, las enfermedades infecciosas son parte de los factores más serios que afectan el desarrollo de la acuicultura. En Chile, la piscirickettsiosis es considerada la principal causa de mortalidades en los cultivos de salmónidos al sur del país, y los intentos por controlar los brotes de la enfermedad mediante el uso de antibióticos han sido infructuosos. Además, las vacunas comerciales disponibles preparadas a base de bacterinas con el patógeno completo han tenido resultados variables y la documentación sobre su eficacia en pruebas experimentales y de campo es escasa. A partir de esto, se planteó la idea de desarrollar una formulación que incluyera a la bacteria completa formando parte de complejos inmunes basándose, primariamente, en los resultados obtenidos en diversos modelos que demuestran que la administración de antígenos microbianos como complejos inmunes mejora la inmunidad a nivel de respuesta innata y adquirida (Brady, 2005). Posteriormente, con los antecedentes recopilados a partir de estudios realizados en salmónidos, se trazaron las directrices del estudio enfocándolo en la comparación del efecto de una formulación basada en complejos inmunes con *P. salmonis* inactivada con el de una formulación preparada con la bacterina libre, sobre el sistema inmune de salmón del Atlántico. De esta forma, se evaluaron parámetros de la inmunidad innata, como el estallido respiratorio de los leucocitos y la actividad de la lisozima, los cuales no se habían medido previamente en estudios con este patógeno y en el modelo animal empleado (salmón del Atlántico). Además, se estudió el efecto de los complejos inmunes sobre la respuesta inmune humoral adquirida, comparando el nivel de anticuerpos en los peces inmunizados.

Para realizar los ensayos de este estudio se dispuso de una cepa de *P. salmonis* cultivada en la línea celular CHSE-214 para la que se calculó, previo a su inactivación con formaldehído, un título de $1,316 \times 10^9$ TCID₅₀/mL (Dosis Infecciosa del 50% del Cultivo Celular) según el método de Reed y Muench (1938). La concentración de bacteria calculada por citometría de flujo fue aproximadamente un

orden de magnitud menor ($7,5 \times 10^7$ bacterias/mL). Esta disminución se atribuyó al proceso de semipurificación, mediante centrifugaciones diferenciales sucesivas, al que se sometió la suspensión bacteriana para separarla de los restos celulares que pudieran haber sido incorporados durante su recolección, lo cual puede haber contribuido a la pérdida de parte de las bacterias. La tinción de la bacteria con el colorante fluorescente EthD-1 (homodímero de etidio- 1), permitió distinguirla eficientemente del material remanente en la suspensión bacteriana. Las características estructurales del colorante le permiten penetrar específicamente en células muertas. Además, su fluorescencia aumenta más de 40 veces después de unirse a los ácidos nucleicos, por lo que tiene una afinidad mucho mayor que otros colorantes como bromuro de etidio o yoduro de propidio, lo cual resulta en que prácticamente no se produzca fluorescencia de fondo y no se requiera lavar las células después de agregarlo, requiriendo pequeños volúmenes de muestra y cortos tiempos de incubación (Haugland y cols., 1994). Asimismo, la suspensión de microesferas funcionó eficientemente como estándar para estimar el volumen de muestra analizado calculándose concentraciones bacterianas muy similares en distintos ensayos. Los resultados obtenidos demuestran que esta técnica puede emplearse como un método alternativo para cuantificar *P. salmonis* u otros patógenos de peces cuyas condiciones de cultivo hacen que deban someterse a procesos durante los cuales pueden verse afectadas por pérdidas. En efecto, el uso de colorantes de ácidos nucleicos en conjunto con las técnicas de citometría de flujo ha resultado muy útil para la cuantificación e identificación de virus en sistemas acuáticos, permitiendo análisis más rápidos de poblaciones con diferente morfología y contenido de ADN (Brussaard, 2004).

El principal aporte del método empleado es que permitió hacer una estimación más acorde a las condiciones temporales de la suspensión bacteriana, de manera mucho más simple y rápida que el método de Reed y Muench, utilizado tradicionalmente.

Los resultados obtenidos con vacunas basadas en bacterinas de patógenos inactivados con formaldehído han sido muy buenos en el caso de patologías como la vibriosis, sin embargo en el caso de *P. salmonis* los resultados han sido menos efectivos (Sommerset y cols., 2005), evidenciando la complejidad de la elaboración de una vacuna contra este patógeno. Una de las principales desventajas atribuidas

a estas vacunas sería la disminución de la inmunogenicidad del patógeno inducida por el tratamiento con formaldehído. Aunque según las observaciones de Mason y O'Leary (1991) las proteínas fijadas conservarían la estructura secundaria presente antes de la fijación, se sabe que el formaldehído interactúa con diversos grupos del esqueleto aminoacídico pudiendo alterar la constitución o estructura de los antígenos (Montero, 2003).

Por esto, con el fin de mejorar las propiedades de la bacterina como vacuna, en este estudio se prepararon CIs con *P. salmonis* inactivada con formaldehído y antisuero policlonal de conejo. La elección de utilizar antisuero de conejo se basó en los antecedentes recopilados que sugieren que los leucocitos de salmónidos pueden interactuar con las inmunoglobulinas del suero de conejo, lo cual presenta varias ventajas. En primer lugar, pueden obtenerse volúmenes considerablemente mayores que los obtenidos en salmón del Atlántico, en segundo lugar, los títulos de estos sueros son también mucho mayores que los determinados en peces, y por último, en nuestro laboratorio se observó en reiteradas ocasiones que al someter el suero de salmónes a las temperaturas mencionadas en la literatura para su inactivación, se producía la gelificación de éstos, reflejando un proceso de desnaturalización proteica, por lo que el uso de suero de conejos tendría una ventaja adicional en términos de su manejo, ya que su inactivación es un método estandarizado y durante el estudio se utilizó sin problemas.

La determinación de la proporción óptima antígeno:anticuerpo fue compleja. Ensayos preliminares para determinarla mediante inmunodifusión y cuantificación de proteínas no funcionaron o llevaron a resultados erróneos. Debido a estos resultados se optó por determinar la proporción óptima antígeno-anticuerpo a través de citometría de flujo. Este método funcionó muy bien ya que la determinación se hizo rápidamente y el marcaje doble de los complejos permitió diferenciar claramente la bacterina libre de la bacterina complejada, similar a lo descrito por Houston y cols. (1974), quienes a través de una modificación a una técnica de radioinmunoanálisis lograron determinar exitosamente la zona de equivalencia entre el virus inactivado de la encefalitis equina venezolana (VEE) e IgG específicas.

Dada la gran cantidad de especies y la distancia evolutiva entre distintas familias de teleósteos, es importante tener en cuenta que la inmunología de peces

no puede considerarse como un sistema homogéneo. Por lo tanto, es probable que especies distintas tengan diferencias importantes en la forma en que combaten a los patógenos y también en su respuesta a las vacunas (Somerset y cols., 2005).

Tradicionalmente, la mayoría de los estudios en el desarrollo de vacunas contra piscirickettsiosis para salmón del Atlántico se han enfocado en la evaluación del nivel de anticuerpos y el porcentaje relativo de supervivencia tras el desafío. Aunque este último ensayo es esencial para evaluar la eficacia de una vacuna, la monitorización de mecanismos de la respuesta inmune innata de los peces tras una inmunización puede proporcionar valiosos datos acerca de la evolución de esta respuesta. Además, como las especies en cultivo se exponen permanentemente a numerosas condiciones estresantes, un mayor conocimiento de la inmunología de las especies piscícolas mejora nuestra capacidad para desarrollar vacunas efectivas

Uno de los objetivos de este estudio fue comparar el efecto de dos formulaciones con *P. salmonis* libre y complejada en coadyuvante, sobre algunos parámetros innatos celulares y humorales en salmónes del Atlántico. Para medir el estallido respiratorio de los leucocitos del riñón anterior a través de la reducción de NBT, se implementó un método basado en el descrito por Secombes (1990) ya que en experimentos preliminares no se reprodujo. Los resultados de estos ensayos se asociaron a la dificultad para obtener un número suficiente de leucocitos durante la etapa de purificación por centrifugación en gradiente, probablemente porque los salmónes empleados, eran de menor tamaño (20-25g) que los utilizados en los estudios de referencia (>100g). Otra dificultad observada fue la incapacidad de adhesión de los leucocitos de salmón a la superficie de las placas plásticas o a la de portaobjetos de vidrio, por lo que en los lavados requeridos durante el ensayo se perdía la mayoría de las células. El ensayo implementado, incluyó el uso del riñón anterior completo, lo cual incrementó el número de células disponibles. Además, el recubrimiento de los pocillos de las placas con microcarriers facilitó la adherencia de los leucocitos, según se pudo observar por microscopía. Con estas modificaciones, se logró medir efectivamente la producción basal de ión superóxido en los salmónes incluidos en el ensayo de inmunización. Sólo se observaron diferencias significativas entre los grupos al día 6 p.i., destacándose una elevada

respuesta de los peces inmunizados con CI, y al día 11 p.i., en que el grupo control presentó una respuesta mayor que el grupo inmunizado con la bacterina sin complejar. En estudios en los que se ha evaluado el estallido respiratorio de salmones del Atlántico expuestos *in vitro* e *in vivo* a compuestos inmunoestimulantes o tras la infección experimental con algún patógeno, se ha demostrado que la adición de PMA (forbol miristato acetato), un activador del estallido respiratorio, a los cultivos celulares aumenta la producción de especies radicales de oxígeno revelando diferencias significativas que no se detectaron en los cultivos no tratados (Brattgjerd y cols., 1994, Gross y cols., 2005). En este estudio no se logró determinar una concentración estimuladora óptima de PMA en ensayos preliminares, por lo que no se pudo evaluar su efecto sobre las mediciones obtenidas. Sin embargo, la estimulación de la respuesta *in vivo* mostró algunas diferencias importantes entre los tratamientos y dentro de cada grupo. Una observación interesante, fue que la respuesta del grupo inmunizado con CI se mantuvo constante y prolongada en el tiempo, en comparación con la respuesta observada para la bacterina libre que mostró una tendencia a la disminución, sugiriendo un rol importante de la interacción de los CI con los receptores Fc presentes en los leucocitos, lo cual puede favorecer la inducción de una mejor respuesta inmune en salmón del Atlántico.

Bajo las condiciones de estimulación *in vitro*, no se logró establecer diferencias significativas entre los tratamientos y el control. Estos resultados tendrían relación con el tiempo de exposición a los antígenos probados, ya que en estudios con *Salmo salar* se describen prolongados períodos de estimulación, además del uso de PMA (Dalmo y cols., 1995; Bridle y cols., 2005). Sin embargo, pese al carácter preliminar del ensayo, la estandarización de las condiciones de trabajo permitirá optimizar el protocolo implementado para futuras investigaciones.

Los factores innatos humorales se vieron afectados positivamente por la administración de CI. En el grupo inmunizado con CI la actividad de la lisozima fue significativamente mayor que la del grupo control durante todo el ensayo, y a partir del día 11, el aumento de la respuesta del grupo inmunizado con CI fue el doble o el triple de la respuesta del grupo inmunizado con la bacterina libre, lo cual demuestra

una mejora importante de la respuesta inmune innata de los salmones frente a *P. salmonis*.

En comparación con la activación del estallido respiratorio, en el ensayo de la actividad de la lisozima las diferencias significativas se distinguieron notoriamente. Por otro lado, la activación del estallido respiratorio al día 6 y 11 p.i. fue similar a la estimulación de la producción de lisozima en los días 11 y 14 p.i, respectivamente. Los resultados de estos ensayos concuerdan en parte con el trabajo de Paulsen y cols. (2001), quienes estudiaron la producción de lisozima *in vitro* en cultivos de macrófagos del riñón anterior de salmón del Atlántico tratados con LPS y β - glucano de levadura, sugiriendo que este órgano al cumplir una función hematopoyética probablemente representa a una población de células en diferentes estados de maduración, donde la producción de lisozima refleja una combinación de activación y maduración de los macrófagos. De este modo, aunque no se sabe si los altos niveles de lisozima observados en los salmones inmunizados con CI protegen efectivamente al pez, los resultados del presente trabajo sugieren que en salmón del Atlántico los mecanismos estudiados son regulados diferencialmente en el tiempo, y son afectados distintamente según la forma de administración de *P. salmonis*. La bacterina libre induciría una activación temprana de respuestas innatas que luego van disminuyendo en el tiempo, teniendo incluso efectos inmunosupresores que no fueron abolidos por la inactivación de la bacteria. Los CI, en cambio, inducirían en una primera etapa una activación potente de las funciones de defensa innata celulares en el riñón anterior, el cual posteriormente daría origen a monocitos que una vez en el torrente sanguíneo se encargarían de la producción de factores microbicidas como la lisozima.

Debido a la descripción de *P. salmonis* como un microorganismo intracelular estricto, se ha asignado un rol secundario a la repuesta inmune humoral adquirida de los salmónidos frente a este patógeno (Kuzyk y cols., 1996). Sin embargo, se ha demostrado para numerosos patógenos intracelulares, la capacidad de los anticuerpos de modificar el curso de la infección en beneficio del huésped (Casadevall, 2003). En este estudio se evaluó la cinética de la producción de anticuerpos contra *P. salmonis* en el suero de salmones del Atlántico incluidos en el ensayo de inmunización. Dada la alta variabilidad registrada, no fue posible

determinar diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos. Sin embargo, dentro de cada grupo se observaron tendencias en el desarrollo de la respuesta destacando que al igual que en los ensayos de la inmunidad innata, el grupo inmunizado con la bacterina libre experimentó una tendencia a la disminución de su respuesta, siendo en el día 65 p.i., significativamente menor que en los días 36 y 43 p.i. Esto concuerda con las observaciones de Smith y cols. (1997), quienes evaluaron la respuesta inmune humoral adquirida de salmones como inmunizados con diversas formulaciones preparadas con distintas concentraciones de la bacterina. Aunque no se proporcionaron mayores detalles, después del día 60 p.i. la magnitud de la respuesta disminuyó constantemente tanto en el grupo inmunizado con la formulación sin coadyuvante como en la que lo contenía, lo cual sugiere que la presencia de éste no suprime los efectos inmunosupresores aparentemente presentes en la bacterina, siendo incluso perjudicial si se considera el hecho de que una de las propiedades de los coadyuvantes consiste en la liberación lenta de pequeñas cantidades del antígeno, sometiendo al pez a una exposición prolongada a los factores inmunosupresores del patógeno.

La respuesta observada en el grupo control, cuyo nivel de anticuerpos igualó durante gran parte del ensayo al del grupo inmunizado con CI, sugirió la exposición previa de los peces a microorganismos que poseen estructuras antigénicas similares a antígenos de *P. salmonis*. El ensayo de aglutinación aclaró en parte estas observaciones al mostrar la reacción positiva de los sueros de todos los grupos y también de sueros de individuos no inmunizados con *Arthrobacter* aislada de ovas de salmón. La reacción cruzada de antígenos de *P. salmonis* con anticuerpos policlonales de conejo anti-*Arthrobacter* se ha descrito previamente a través de ensayos de Western blot que determinaron una fuerte afinidad de estos anticuerpos por ciertas proteínas de *P. salmonis*. Estos experimentos demostraron que ciertas proteínas de ambas bacterias presentan reactividad cruzada, indicando que aquellas proteínas de *Arthrobacter* pueden estimular al sistema inmune a producir anticuerpos potencialmente capaces de reconocer y proteger contra cepas virulentas de *P. salmonis* (Salonius, 2005). Por otro lado, la reacción observada frente a *Flavobacterium psychrophilum* demostró la probable exposición previa a este patógeno. Estas observaciones sugieren que podría compartir estructuras antigénicas con *P. salmonis*, las cuales, en estudios con vacunas polivalentes, se

han asociado a la presencia de epítopes comunes dentro del LPS (Nikoskelainen y cols., 2007). Estos resultados demuestran que la medición del nivel de anticuerpos frente a *P. salmonis* puede verse fuertemente afectada por la exposición previa a microorganismos con los que podría compartir estructuras antigénicas, lo cual es una condición muy probable bajo las condiciones de cultivo intensivo de salmones.

8. CONCLUSIONES

- La utilización de técnicas de citometría de flujo en conjunto con colorantes fluorescentes de ácidos nucleicos, permitió optimizar la cuantificación de *P. salmonis* inactivada sometida a procesos de semipurificación. Asimismo, facilitó la determinación de la proporción óptima de bacterina y antisuero, necesaria para preparar complejos inmunes, requiriendo pequeñas cantidades de muestra y cortos tiempos de incubación.
- La inmunización con complejos inmunes con *P. salmonis* mejoró la respuesta inmune innata en salmón del Atlántico ya que indujo una mayor actividad de los leucocitos comparado con la bacterina libre, lo cual fue demostrado por el aumento de la actividad de la lisozima en suero, y la producción de ión superóxido.
- No se determinaron diferencias estadísticamente significativas en el nivel de anticuerpos entre el grupo control y los grupos inmunizados con *P. salmonis* libre y complejada, detectándose además una respuesta semejante entre el grupo control y el grupo inmunizado con complejos inmunes. Los resultados del ensayo de aglutinación sugirieron la exposición previa de los peces a microorganismos que pueden compartir estructuras antigénicas con *P. salmonis*.
- Bajo las condiciones del estudio, la formulación de *P. salmonis* inactivada preparada en coadyuvante produjo efectos inmunosupresores en salmón del Atlántico.
- No se determinaron diferencias significativas en la actividad del estallido respiratorio de leucocitos de salmón tratados *in vitro* con complejos inmunes o con la bacterina libre. La respuesta inducida por ambos tratamientos fue similar y sugirió una dependencia de la dosis agregada.

9. PROYECCIONES

- Debido al impacto negativo de la piscirickettsiosis en la salmonicultura nacional y la gran importancia del salmón del Atlántico para esta industria, con los resultados obtenidos en este estudio, se espera contribuir a la profundización en el conocimiento de la respuesta inmune de esta especie frente a *P. salmonis*. Por otro lado, aportar herramientas metodológicas para futuras investigaciones que estudien, la correlación entre el nivel de protección inducido y su duración, con la evaluación de la inmunidad innata y adquirida, de manera que sea posible predecir la efectividad de vacunas experimentales en etapas tempranas luego de la inmunización.
- Los resultados obtenidos en este estudio proporcionan evidencia preliminar sobre la aplicación de complejos inmunes en el campo de la vacunación de *Salmo salar* contra la piscirickettsiosis. Esto ha permitido proyectar nuevas investigaciones con el fin de desarrollar una vacuna que otorgue una protección duradera que cubra el ciclo de vida productivo del salmón del Atlántico.

10. REFERENCIAS

- Almendras, F.E., Fuentealba, I.C. 1997. Salmonid rickettsial septicemia caused by *Piscirickettsia salmonis*: a review. *Dis. Aquat. Org.* 29: 137-44.
- Anderson, D.P. 1997. Adjuvants and immunostimulants for enhancing vaccine potency in fish. *Dev Biol Stand.* 90: 257-65.
- Bandin, I., Ellis, A.E., Barja, J.L. & Secombes, C.J. 1993. Interaction between rainbow trout macrophages and *Renibacterium salmoninarum in vitro*. *Fish Shellfish Immunol.* 3: 25-33.
- Bandin, I., Rivas, C., Santos, Y., Secombes, C. J., Barja, J. L. & Ellis, A. E. 1995. Effect of serum factors on the survival of *Renibacterium salmoninarum* within rainbow trout macrophages. *Dis. Aquat. Org.* 23:221–27.
- Barnes, A.C., Guyot, C., Hansen, B.G., Horn, M.T., Ellis, A.E. 2002. Antibody increases phagocytosis and killing of *Lactococcus garvieae* by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, L.) macrophages. *Fish Shellfish Immunol.* 12:181-6.
- Birkbeck, T.H., Griffen, A.A., Reid, H.I., Laidler, L.A., Wadsworth S. 2004. Growth of *Piscirickettsia salmonis* to high titers in insect tissue culture cells. *Infect. Immun.* 72:3693-4.
- Bordevik, M. 2006. The Mysterious *Piscirickettsia salmonis* and its residence inside cells and macrophages. En: SEMINARIO INTERNACIONAL “Status de la Septicemia Rickettsial de los Salmonideos (SRS) en Chile”. 23 y 24 de Agosto de 2006. Puerto Varas.
- Brady, L.J. 2005. Antibody-mediated immunomodulation: a strategy to improve host responses against microbial antigens. *Infect Immun.* 73:671-8.
- Brattgjerd, S., Evensen, O., Lauve A. 1994. Effect of injected yeast glucan on the activity of macrophages in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., as evaluated by *in vitro* hydrogen peroxide production and phagocytic capacity. *Immunology.* 8:288-94.
- Bravo, S. 1994. *Piscirickettsiosis* in freshwater. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* 14: 137-138.
- Bravo, S., Dölz, H., Silva, M.T., Lagos, C., Millanao, A., Urbina, M. 2005. Diagnostico del uso de fármacos y otros productos químicos en la acuicultura. Proyecto FIP 2003-28. [en línea]. <http://www.fip.cl/prog_subprog/acuicultura.htm>.
- Bravo, S., Midtlyng, P.J. 2007. The use of fish vaccines in the Chilean salmon industry 1999-2003. *Aquaculture.* 270: 36-42.

- Bridle, A.R., Carter, C.G., Morrison, R.N., Nowak, B.F. 2005. The effect of beta-glucan administration on macrophage respiratory burst activity and Atlantic salmon, *Salmo salar* L., challenged with amoebic gill disease--evidence of inherent resistance. *J Fish Dis.* 2005 28:347-56.
- Brussaard, C.P. 2004. Optimization of procedures for counting viruses by flow cytometry. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:1506-13
- Cabello, F.C. 2006. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environment. Microbiol.* 8: 1137-44
- Campos-Pérez, J. J., Ellis, A. E. & Secombes, C. J. 1997. Investigation of factors influencing the ability of *Renibacterium salmoninarum* to stimulate rainbow trout macrophage respiratory burst activity. *Fish Shellfish Immunol.* 7: 555-66.
- Casadevall, A. 2003. Antibody-mediated immunity against intracellular pathogens: two-dimensional thinking comes full circle. *Infect Immun.* 71:4225-8.
- Cvitanich, J.D., Garate, N.O., Smith, C.E., 1991. The isolation of a rickettsia-like organism causing disease and mortality in Chilean salmonids and its confirmation by Koch's postulate. *J. Fish Dis.* 14: 121-45.
- Dalmo, R. A., Seljelid, R. 1995. The immunomodulatory effect of LPS, laminaran and sulphated laminaran [β (1,3)-D-glucan] on Atlantic salmon, *Salmo salar* L., macrophages *in vitro*. *J. of Fish Dis.* 18: 175-85.
- Dixon, B. and Stet, R.J. 2001. The relationship between major histocompatibility receptors and innate immunity in teleost fish. *Dev. Comp. Immunol.* 25:683-99.
- Ellis A.E.. 1999. Immunity to bacteria in fish. *Fish Shellfish Immunol* 9:291-308.
- Ellis, A.E. 2001. Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. *Dev. Comp. Immunol.* 25:827-39.
- Fryer, J.L., Lannan, C.N., Giovannoni, S.J., Wood, N.D., 1992. *Piscirickettsia salmonis* gen. nov., sp. nov., the causative agent of an epizootic disease in salmonid fishes. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42:120-26.
- Fryer, J.L., Hedrick, R.P. 2003. *Piscirickettsia salmonis*: a Gram-negative intracellular bacterial pathogen of fish. *J. Fish Dis.* 26:251-62.
- Fujiki, K., Shin, D. H., Nakao, M. & Yano, T. 2000. Molecular cloning and expression analysis of carp (*Cyprinus carpio*) interleukin-1 β , high affinity immunoglobulin E Fc receptor γ subunit and serum amyloid A. *Fish Shellfish Immunol.* 10: 229-242.
- Gaggero, A., Castro, H., Sandino, A.M. 1995. First isolation of *Piscirickettsia salmonis* from coho salmon, *Oncorhynchus kisutch* (Walbaum), and rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), during the freshwater stage of their life cycle. *J. Fish Dis.* 18:277-279.

- Graham, S., Jeffries, A.H., Secombes, C.J. 1988. A novel assay to detect macrophage bactericidal activity in fish: factors influencing the killing of *Aeromonas salmonicida*. J. Fish Dis. 11:389-96.
- Grimholt, U., Larsen, S., Nordmo, R., Midtlyng, P., Kjoeglum, S., Storse, A, Saebo, S., Stet, R.J. 2003. MHC polymorphism and disease resistance in Atlantic salmon (*Salmo salar*); facing pathogens with single expressed major histocompatibility class I and class II loci. Immunogenetics. 55: 210–19.
- Gross, K.A., Powell, M.D., Butler, R., Morrison, R.N., Nowak, B.F. 2005. Changes in the innate immune response of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., exposed to experimental infection with *Neoparamoeba* sp. J. Fish Dis. 28:293-9 .
- Hansen, J.D., Strassburger, P., Thorgaard, G.H., Young, W.P., Du P.L. 1999 Expression, linkage, and polymorphism of MHC-related genes in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. J Immunol 163:774–86.
- Haugland, R.P., MacCoubrey, I.C., Moore, P.L. 1994. Dual-fluorescence cell viability assay using ethidium homodimer and calcein AM. United States Molecular Probes, Inc. (Eugene, OR). 5314805. [en línea].
<<http://www.freepatentsonline.com/5314805.html>>.
- Haynes, L., Fuller, L., McKinney, E.C. 1988. Fc receptor for shark IgM. Dev Comp Immunol. 12:561-71.
- House, M.L, Bartholomew, J.L., Winton, J.R., Fryer, J.L. 1999. Relative virulence of three isolates of *Piscirickettsia salmonis* for coho salmon *Oncorhynchus kisutch*. Dis. Aquat. Organ. 29:107-13.
- Houston, W.E., Pedersen, C.E. Jr, Cole, F.E. Jr, Spertzel, R.O. 1974. Effects of antigen-antibody complexes on the primary immune response in *Rhesus monkeys*. Infect. Immun. 10:437-42.
- Jansson, E., Gronvik, K.O., Johannisson, A., Naslund, K., Westergren, E., Pilstrom, L. 2003. Monoclonal antibodies to lymphocytes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fish Shellfish Immunol. 14:239-57.
- Jorgensen, J.B., Robertsen, B. 1995. Yeast beta-glucan stimulates respiratory burst activity of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) macrophages. Dev. Comp Immunol.19:43-57.
- Joseph, T., Kibenge, M. T. & Kibenge, F. S. B. 2003. Antibody-mediated growth of infectious salmon anaemia virus in macrophage-like fish cell lines. J. Gen. Virol. 84:1701–10.
- Kodama, H., Yamada, F., Murai, T., Nakanishi, Y., Mikami, T. & Izawa, H. 1989. Activation of trout macrophages and production of CRP after immunization with *Vibrio anguillarum*. Development & Comparative Immunology. 13:123–32.

- Kollner, B., Blohm, U., Kotterba, G., Fischer, U. 2001. A monoclonal antibody recognising a surface marker on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) monocytes. *Fish Shellfish Immunol.* 11:127-42.
- Kuzyk, M.A., Thorton, J.C., Kay, W.W. 1996. Antigenic characterization of the salmonid pathogen *Piscirickettsia salmonis*. *Infect Immun.* 64:5205-10.
- Kuzyk, M.A., Burian J., Machander D., Dolhaine D., Cameron S., Thornton J.C. & Kay W.W. 2001. An efficacious recombinant subunit vaccine against the salmonid rickettsial pathogen *Piscirickettsia salmonis*. *Vaccine.* 19: 2337-44.
- Lamas, J., Ellis, A.E.1994. Atlantic salmon (*Salmo salar*) neutrophil responses to *Aeromonas salmonicida*. *Fish Shellfish Immunol.* 4:201-19.
- Lannan, C.N, Fryer, J.L. 1994. Extracellular survival of *Piscirickettsia salmonis* . *J. Fish Dis.* 17: 545–548.
- Larenas, J., Galleguillos, M., Adarmes, H., Ramírez, A.M., Gatica, C., Smith, P.A. 2006. Virulence and electrophoretic profiles of the *Piscirickettsia salmonis* type strain LF-89 in different culture passage numbers. *Bull. Eur. Fish Pathol.* 26: 247-51.
- Li, J., Barreda, D.R., Zhang, Y.A., Boshra, H., Gelman, A.E., Lapatra, S., Tort, L., Sunyer, J.O. 2006. B lymphocytes from early vertebrates have potent phagocytic and microbicidal abilities. *Nat Immunol.* 7:1116-24.
- Luco, R., Proessel, O., Bahamonde, R. Parte 3: La Acuicultura en Chile. [en línea]. <<http://www.bibliotecnica.upc.es/bib280/cursmari/parte3.pdf>>.
- Magnadottir, B., Innate immunity of fish (overview). *Fish Shellfish Immunol.* 2006. 20:137-51.
- Martz, E. 2000. Introduction to Flow Cytometry for Microbiology 542. Immunology Laboratory. University of Massachusetts, Amherst MA US. [en línea].<<http://www.bio.umass.edu/micro/immunology/facs542/facsprin.htm>>.
- Mason, J.T., O'Leary, T.J. 1991. Effects of formaldehyde fixation on protein secondary structure: a calorimetric and infrared spectroscopic investigation. *J Histochem. Cytochem.* 39:225-9.
- Michel, C., Gonzalez, R., Bonjour, E., Avrameas, S. 1990. A concurrent increasing of natural antibodies and enhancement of resistance to furunculosis in rainbow trout. *Ann. Rech. Vet.* 21:211-8.
- Michel, C., Dorson, M. & Faivre, B. 1991. Oponising activity of anti-*Aeromonas salmonicida* antibodies after inactivation of complement in rainbow trout. *Annals Recherche Veterinaire* 22: 51-88.
- Miquel, A., Müller, I., Ferrer, P., Valenzuela, P.D., Burzio, L.O. 2003. Immunoresponse of Coho salmon immunized with a gene expression library from *Piscirickettsia salmonis*. *Biol Res.*36:313-23.

Montero, C. 2003. The antigen-antibody reaction in immunohistochemistry. *J Histochem. Cytochem.* 51:1-4.

Neumann, N.F., Stafford, J.L., Barreda, D., Ainsworth, A.J., Belosevic, M. 2001. Antimicrobial mechanisms of fish phagocytes and their role in host defense. *Dev. Comp. Immunol.* 25:807-25.

Nikoskelainen, S., Verho, S., Järvinen, S., Madetoja, J., Wiklund, T., Lilius, E-M. 2007. Multiple whole bacterial antigens in polyvalent vaccine may result in inhibition of responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Shellfish Immunol.* 22:206-17.

O'Dowd, A.M., Ellis, A.E. and Secombes C.J.. 1999. Binding of soluble immune complexes to fractionated Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) leucocytes. *Vet Immunol Immunopathol.* 68: 149–57.

Olabuenaga, S.E. 2000. Sistema inmune en peces. *Gayana (Concepc.)*. 64:205-15. [en línea]. <http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-65382000000200010&lng=es&nrm=iso>.

Paulsen, S.M., Engstad, R.E., Robertsen, B. 2001. Enhanced lysozyme production in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) macrophages treated with yeast beta-glucan and bacterial lipopolysaccharide. *Fish. Shellfish Immunol.* 11:23-37.

Pettersen, E.F., Bjerknes, R., Wergeland, H.I. 2000. Studies of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) blood, spleen and head kidney leucocytes using specific monoclonal antibodies, immunohistochemistry and flow cytometry. *Fish Shellfish Immunol.* 10:695-710.

Pilström, L. 2003. Adaptive immunity in teleosts; humoral immunity. 3rd International Symposium on Fish Vaccination. Bergen, Norway.

Press, C., McL., Evensen, Ø., Reitan, L.J., Landsverk, T. 1996. Retention of furunculosis vaccine components in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., following different routes of vaccine administration. *Journal of Fish Diseases*, 19, 215-24.

Reed, L. J., and H. Muench. 1938. A simple method of estimating 50 per cent end-points. *Amer. Jour. Hygiene*, 27: 493-97.

Rise, M.L., Jones, S.R., Brown, G.D., von Schalburg, K.R., Davidson, W.S., Koop, B.F. 2004. Microarray analyses identify molecular biomarkers of Atlantic salmon macrophage and hematopoietic kidney response to *Piscirickettsia salmonis* infection. *Physiol. Genomics.* 20:21-35

Salmon Chile. 2006. Informe económico salmonicultura 2006. [en línea]. <<http://www.aqua.cl/programas/pdf/InformeEconomico2006.pdf>>.

Salonius, K., Griffiths, S. G. 2005. Vaccine against salmonid rickettsial septicaemia based on arthrobacter cells. 20050129714. [en línea]. <<http://www.freepatentsonline.com/20050129714.html>>.

Secombes, C.J., Resink J.W. 1984. The immune response of carp. *Cyprinus carpio* L., following injection of. antigen-antibody complexes. J. Fish Biol. 24:193-200.

Secombes C.J. 1990. Isolation of salmonid macrophages and analysis of their killing activity. In: Stolen, J.S, Fletcher, T.C., Anderson, D.P., Roberson, B.S. & van Muiswinkel, W.B., editors. Techniques in Fish Immunology. SOS Publications. Fair Haven, N J (1990). 137-54.

Sharp, G. J. E., Secombes, C. J. 1993. The role of reactive oxygen species in the killing of the bacterial fish pathogen *Aeromonas salmonicida* by rainbow trout macrophages. Fish & Shellfish Immunology. 3: 119-129.

Shoemaker, C.A., Klesius, P.H., Xu, D., Shelby, R.A. 2005. Overview of the immune system of fish. Aquaculture America Conference.

Smith, P.A, Contreras, J.R., Larenas, J.J. et al. 1997. Immunization with bacterial antigens: piscirickettsiosis. En: Gudding, R., Lillehaug, A., Midtlyng, P.J., Brown, F., editors. Fish Vaccinology. Dev. Biol. Stand. Basel, Karger. 161-6.

Smith, P.A., Rojas, M.E., Guajardo, A., Contreras, J., Morales, M.A., Larenas, J. 2004. Experimental infection of coho salmon *Oncorhynchus kisutch* by exposure of skin, gills and intestine with *Piscirickettsia salmonis*. Dis. Aquat. Organ. 21:53-7.

Solem, S.T., Jorgensen, J.B., Robertsen, B. 1995. Stimulation of respiratory burst and phagocytic activity in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) macrophages by lipopolysaccharide. Fish Shellfish Immunol. 5: 475-491.

Sommerset, I., Krossøy, B., Biering, E., Frost P. 2005. Vaccines for fish in aquaculture. Expert. Rev. Vaccines. 4:89-101.

Sorensen, U.B., Larsen, J.L. 1986. Serotyping of *Vibrio anguillarum*. Appl. Environ. Microbiol. 51:593-97.

Stafford, J.L., Wilson, M., Nayak, D., Quiniou, S.M., Clem, L.W., Miller, N.W., Bengtén, E. 2006. Identification and characterization of a FcR homolog in an ectothermic vertebrate, the channel catfish (*Ictalurus punctatus*). J. Immunol. 177:2505-17.

Toranzo, A.E., Magariños, B., Romalde, J.L. 2005. A review of the main bacterial fish diseases in mariculture system. Aquaculture 246:37-61.

Vallejo, A.N., Miller, N W., Clem, L.W. 1992. Antigen Processing and Presentation in Teleost Immune Responses. Ann. Rev. Fish Dis.2:73-89

Wilhelm, V., Soza, C., Martínez, R., Roseblatt, M., Burzio, L.O., Valenzuela, P.D. 2005. Production and immune response of recombinant Hsp60 and Hsp70 from the salmon pathogen *Piscirickettsia salmonis*. Biol. Res. 38:69-82.

Wilhelm, V., Miquel, A., Burzio, L.O., Roseblatt, M., Engel, E., Valenzuela, S., Parada, G., Valenzuela, P.D. 2006. A vaccine against the salmonid pathogen *Piscirickettsia salmonis* based on recombinant proteins. Vaccine. 24:5083-91.

Zapata, A., Diez, B., Cejalvo, T., Gutiérrez-de Frías, C., Cortés, A. 2006. Ontogeny of the immune system of fish. *Fish Shellfish Immunol.* 20:126-36.

Páginas web (URL):

<<http://www.aquagestion.cl/areas/diagnostico/nsrs.htm>>.

<http://www.aqua.cl/revistas/n62/not_62.html>.