



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



**ESTABLECIMIENTO DE UNA FASE SÓLIDA PARA LA
DETECCIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA
*Piscirickettsia salmonis***

Claudia Andrea Goycolea Donoso

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Medicina
Preventiva Animal

Profesor Guía: Dr. Pedro Ábalos Pineda

SANTIAGO - CHILE

2007



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



**ESTABLECIMIENTO DE UNA FASE SÓLIDA PARA LA
DETECCIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA
*Piscirickettsia salmonis***

Claudia Andrea Goycolea Donoso

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Medicina
Preventiva Animal

Nota Final:.....

	Nota	Firma
PROFESOR GUÍA : PEDRO ÁBALOS P.
PROFESOR CONSEJERO: JULIO LARENAS H.
PROFESOR CONSEJERO: CLAUDIO ZÚÑIGA M.

SANTIAGO - CHILE

2007

RESUMEN

En el presente estudio se investigó la factibilidad de establecer una fase sólida para realizar un ELISA con el fin de detectar anticuerpos contra *Piscirickettsia salmonis*.

Se realizaron varias etapas en el protocolo de purificación, para la obtención del antígeno. Se obtuvo un antígeno soluble de *P. salmonis* mediante extracción salina, se realizaron centrifugaciones y se liofilizó la muestra, obteniendo 567 mg de antígeno, de los cuales se detectó una cantidad de 0,1 mg de proteína. En las condiciones del ensayo se utilizaron dos tipos de placas, dos tampones de sensibilización y se realizaron incubaciones a diferentes temperaturas.

Para el desarrollo de la prueba de ELISA se utilizó una mezcla de anticuerpos monoclonales específicos contra *P. salmonis* y un antisuero conjugado de cabra anti-ratón.

Como resultados, se obtuvieron reacciones negativas en todos los casos, sin haber alcanzado la razón de adsorción mínima para darle significancia al resultado; sin embargo, existió reacción colorimétrica visible en aquellas muestras procesadas en placas NUNC 69620, incubadas a temperatura ambiente, con tampón de sensibilización carbonato-bicarbonato con pH 9,6; por lo que se podría deducir que entre todos los procedimientos, este último protocolo podría ser el de elección.

Como conclusión se establece que, bajo los protocolos realizados y con las concentraciones antigénicas utilizadas, no fue posible comprobar la adhesión de antígenos de *Piscirickettsia salmonis* a las placas, no pudiéndose establecer una

fase sólida para el diagnóstico de esta bacteria por medio de la detección de anticuerpos.

SUMMARY

The aim of this study was to investigate the feasibility to obtain a solid phase for the detection of antibodies against *Piscirickettsia salmonis* by ELISA.

To obtain the antigen, several stages were made following a purification protocol. A *P. salmonis* soluble antigen was produced through a hot saline extraction method and the yield was centrifuged several times and freeze dried obtaining 567 mg of antigen. The antigen contained 0.1 mg/ml of protein. For this ELISA, two types of microplates, two coating buffers and two incubation temperatures were used. For the development of assay a specific monoclonal antibodies panel against *P. salmonis* and a conjugated of goat anti-mouse IgG antiserum was used.

No results were obtained with the several alternatives, without to have reached the reason of minimum adsorption to give some significance. Nevertheless, some color development reaction in those samples processed in plates NUNC 69620 existed, when incubated at room temperature, with carbonate-bicarbonate pH 9.6 coating buffer.

As conclusion settles down that under the protocols used it was not possible to verify the adhesion of *Piscirickettsia salmonis* antigens to the microplates and was not able to establish a solid phase for the diagnosis of antibodies against this bacterium.

INDICE

INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
1- Agente.....	4
2- Enfermedad y su importancia en Chile.....	6
3- Control.....	12
4- Diagnóstico y sus dificultades.....	14
5- Prueba de ELISA indirecto.....	22
OBJETIVOS	26
▪ General.....	26
▪ Específicos.....	26
MATERIAL Y MÉTODOS	27
I- Preparación del Antígeno.....	27
II- Establecimiento de fase sólida.....	28
III- Desarrollo del ELISA indirecto.....	28
RESULTADOS	31
DISCUSIÓN	35
CONCLUSIONES	39
BIBLIOGRAFÍA	40

INTRODUCCIÓN

La industria salmonera chilena ha logrado un enorme crecimiento y ha pasado a ser un pilar importante de la diversificación económica nacional y en una de las bases fundamentales de la estrategia orientada a convertir a Chile en una potencia alimentaria. El país juega un rol destacado a nivel mundial en la producción de salmón, en los últimos diez años, la industria ha acumulado una tasa anualizada de crecimiento de 15%, este gran desarrollo en la salmonicultura le ha permitido situarse como uno de los líderes a nivel mundial, ocupando hoy el segundo lugar de producción, detrás de Noruega (Quiroz *et al.*, 2005).

El año 2005 cerró con exportaciones chilenas de salmón por US\$ 1.721,5 millones, una cifra 20% superior a la del año anterior, en volúmenes físicos el valor fue 8% superior a lo ocurrido el 2004. Las exportaciones de la salmonicultura representaron un 9,5% de las exportaciones distintas de cobre y un 20,2%, ocupando un segundo lugar de las exportaciones de alimentos del país (Quiroz *et al.*, 2005).

Sin embargo, los productores de salmón saben que la sanidad de los peces es un factor que puede aplacar la expansión de la industria. Ello motiva la labor de investigación que se ha realizado tanto en Chile como en el extranjero para evitar la propagación de enfermedades entre los salmónidos, a través de estudios de patogenia, pruebas de diagnóstico y la búsqueda de variedades genéticas más resistentes. Cifras del Banco Mundial indican que en el mundo la acuicultura ha llegado a perder hasta tres mil millones de dólares al año por enfermedades, algunas ya endémicas, que no se trataron de manera oportuna (Anón, 2000).

A inicios de la década de los noventa, la aparición de diferentes enfermedades como la producida por *Piscirickettsia salmonis* causaron pérdidas de hasta un 90% en centros de engorda de salmones. Esta bacteria fue aislada inicialmente en Chile en 1989, desde centros de cultivo afectados por altas mortalidades y se estima que este microorganismo estaría presente al menos desde 1981. Hasta 1992 se pensó que se trataba de una enfermedad autóctona que se presentaba solamente en el salmón coho, pero posteriormente se identificó la misma bacteria en cultivos de Escocia, Canadá y Noruega. Ahora se sabe que este agente afecta a todas las especies de salmónidos cultivados en Chile, siendo una enfermedad endémica en la mayoría de los centros de cultivo de la Décima Región (Larenas *et al.*, 2000). Recientes reportes de *P. salmonis* y de otros microorganismos similares en nuevos hospederos y regiones geográficas, han aumentado el interés en la bacteria (Fryer y Hedrick, 2003).

La búsqueda de métodos de diagnósticos eficientes y rápidos es una constante en el estudio de piscirickettsiosis. Por ello, un posible diagnóstico serológico, a pesar de la limitada respuesta humoral de los peces, mediante el desarrollo de un ensayo inmunoenzimático indirecto (ELISA), sería un gran avance en el control de la enfermedad.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

El primer reporte de la presencia de un microorganismo similar a rickettsia en peces fue descrito en Egipto el año 1939. Ese año, a partir de la observación de un pez erizo enfermo, especie *Tetraodon fahaka*, se observó dentro de monocitos y en el plasma, pequeñas formas cocoides y eosinofílicas a la tinción Giemsa (Fryer y Mauer, 1997). Por otro lado, el primer aislado en peces de un posible agente rickettsial fue obtenido desde truchas arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) en Alemania (Özel y Schwanz-Pfützner, 1975), sin embargo, este microorganismo no se preservó para futuros estudios.

Otro reporte relacionado al hallazgo de microorganismos similares, se produjo en las costas de Gales, Gran Bretaña. En este caso el organismo similar a rickettsia se encontró en varios especímenes de primillas o “Dragonets” maduros, especie *Callionymus lyra*, de forma casual durante un estudio que buscaba la presencia del parásito sanguíneo *Haemogregarina quadrigemina*

Desde que *Piscirickettsia salmonis* fue caracterizado, muchos agentes similares morfológicamente han sido detectados en peces salmonídeos alrededor del mundo. Uno de estos organismos fue identificado en 1991, en salmones del Atlántico (*Salmo salar*) enfermos recolectados desde cultivos en agua marina Canadiense. En 1992, otro organismo similar a *P. salmonis* fue detectado en Noruega en cortes histológicos de hígado de salmones de Atlántico que presentaban una enfermedad llamada hepatitis necrotizante. Un organismo de este tipo fue también observado en microscopía electrónica de tejidos de salmones del Atlántico cultivados en Irlanda. En 1994, otro organismo morfológicamente similar se asoció a nados anormales en peces juveniles de róbalo o “sea bass” (*Dicentrarchus labrax*) en Francia (Comps *et al.*, 1996). Todos estos organismos producen una patología similar a la asociada

con piscirickettsiosis en salmónidos chilenos, pero la relación precisa entre ellos y *P. salmonis* no ha sido determinada (Fryer y Lannan, 1994).

Al final de los años 80, la industria de la acuicultura en Chile experimentó una considerable mortalidad en los cultivos de lo salmónidos. El salmón coho fue la principal especie involucrada. La mortalidad asociada con los brotes varió de 20% a 30%, alcanzando en algunos casos el 90% (Fryer y Hedrick, 2003).

A pesar de que una gran variedad de antimicrobianos se han utilizado para controlar el patógeno y la enfermedad, ninguno ha tenido una eficiencia suficiente para garantizar su uso (Fryer y Hedrick, 2003).

La enfermedad, aún es el mayor problema para la industria salmonera de nuestro país, aunque ahora es reportada menos severa que en los primeros años. Esto sería debido a un cambio del cultivo del salmón coho, por el más resistente salmón del Atlántico y por progresos en métodos de prevención y de control cuando aparecen brotes (Fryer y Hedrick, 2003). Es necesario recordar que en un inicio debido a la aparente especificidad de la infección por el salmón coho, la tendencia fue por un lado disminuir las densidades y por otro aumentar la producción de salmón del atlántico y trucha arco iris. Frente a esa nueva situación la enfermedad comenzó a diagnosticarse de forma creciente en estas especies (Larenas *et al.*, 1998).

1.- Agente

El agente causal, fue identificado en 1989 por Fryer *et al.* (1990) y Cvitanich *et al.* (1991), a partir de salmónes coho (*O. kisutch*) enfermos provenientes de Chiloé, Chile.

Piscirickettsia salmonis es una bacteria intracelular obligada, gramnegativa, aerobia, no encapsulada, inmóvil y pleomórfica, predominando su forma cocoide. Este microorganismo mide entre 0,5 a 1,5 μm de diámetro, se replica por fisión binaria que se realiza en vacuolas citoplasmáticas de las células hospederas y forma inclusiones citoplasmáticas (Larenas *et al.*, 1998). Para su conservación a -70°C se recomienda el uso de dimetilsulfóxido como criopreservante. La replicación del microorganismo no ha sido posible en un medio libre de células, sólo crece *in vitro* en cultivos celulares de peces (Fryer *et al.*, 1992).

Este microorganismo inicialmente se conoció como agente no identificado. Fryer *et al.* (1990) lograron establecer que correspondía a una bacteria intracelular obligada, que fue denominada cepa LF-89. El análisis del 16S rRNA de la cepa indicó que correspondía a una Gammaproteobacteria distantemente relacionada a *Coxiella burnetti* y quizás a *Wolbachia persica*. Un nuevo género y especie (*Piscirickettsia salmonis* gen. nov., esp. nov.) fue propuesto para este microorganismo y fue designado un nombre para la enfermedad: piscirickettsiosis (Fryer *et al.*, 1992).

Piscirickettsia salmonis, a pesar de ser una bacteria intracelular, nunca fue considerada una Chlamydia, debido a que no se pudo demostrar las formas morfológicas que se asociaban a este grupo de bacterias y además no reaccionó con los anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno específico lipopolisacárido del género Chlamydia (Fryer *et al.*, 1992). Por lo tanto, hasta ese tiempo fue mejor considerar a *P. salmonis* como miembro de la familia Rickettsiaceae hasta que estudios posteriores, basados en el análisis de secuencia del gen 16S rRNA, confirmaron que correspondía a una Gammaproteobacteria (Fryer y Hedrick, 2003).

La Clase Gammaproteobacteria incluye al Género *Francisella*, *Legionella* y *Coxiella*. Por el contrario, el Género *Rickettsia*, *Neorickettsia*, *Cowdria* y *Ehrlichia* son rickettsias y son miembros de la clase Alphaproteobacteria (Fryer y Hedrick, 2003).

El género *Piscirickettsia* ha sido ubicado dentro del orden Thiotrichales y en la nueva familia *Piscirickettsiaceae*. La familia *Piscirickettsiaceae* contiene bacterias que son gramnegativas, aeróbicas, cocoides, en forma de barra o espiral, ocasionalmente pleomórficas y comúnmente aisladas desde ambientes marinos. Esta familia contiene a cinco géneros, *Piscirickettsia*, *Cycloclasticus*, *Hydrogenovibrio*, *Methylophaga* y *Thiomicrospira*. Estos géneros están relacionados filogenéticamente, ya que tienen secuencias de 16S rRNA similares, pero tienen pocas características fenotípicas en común (Fryer y Hedrick, 2003).

Estudios de Smith *et al.* (1996a) lograron aislar nuevas cepas; una a partir de trucha arco iris (*O. mykiss*) en 1994 llamada SLGO-94 y otra desde salmón coho en 1995 llamada SLGO-95. Estos aislados demuestran diferencias en su virulencia y resistencia a antibióticos en relación a la cepa tipo (LF-89).

House *et al.* (1999) buscaron comparar las diferencias en virulencia entre aislados de *P. salmonis* desde Chile, Canadá y Noruega (LF-89, ATL-4-91 y NOR-92, respectivamente). Mediante la inyección intraperitoneal de cada cepa en salmónes coho, se comparó la mortalidad acumulada en cada grupo de salmónes. La cepa más virulenta resultó ser la LF-89 y menos virulenta la NOR-92.

2.- Enfermedad y su importancia en Chile

La enfermedad que produce *Piscirickettsia salmonis* ha sido denominada de diversas formas tales como, síndrome de Huito, síndrome del salmón coho

(Bravo y Campos, 1989), síndrome rickettsial salmonídeo (SRS) (Cvitanich *et al.*, 1991) y piscirickettsiosis (Fryer *et al.*, 1992).

Es conocido que esta enfermedad está ampliamente propagada geográficamente, observándose en Irlanda, Escocia, Noruega y en la costa del océano pacífico de Canadá, sin embargo la virulencia de ésta varía considerablemente según el lugar. En Chile, *Piscirickettsia salmonis*, es un patógeno importante en el ámbito económico, es responsable de alta mortalidad en la industria salmonera, donde extensivas epizootias se repiten constantemente, mientras en los otros países la mortalidad es de 0,06 % y la presentación de la enfermedad es esporádica (Mauel y Miller, 2002).

En 1995, más de diez millones de salmones murieron durante la fase marina. La mayoría de las muertes fueron atribuidas a la piscirickettsiosis y las pérdidas económicas fueron aproximadamente US \$49 millones (Smith *et al.*, 1997).

Desde el primer reporte, la piscirickettsiosis se ha transformado en el mayor problema de enfermedad en Chile, causando alta mortalidad en cultivos de salmones en agua marina (Mauel y Miller, 2002).

Bravo y Campos (1989) suponían que *P. salmonis* era específica, ya que sólo afectaba al salmón coho (*O. kisutch*), y no a la trucha arco iris (*O. mykiss*) ni el salmón del Atlántico (*Salmo salar*). A comienzos de 1990, la enfermedad fue reportada por primera vez en salmón del Atlántico (*S. salar*) y posteriormente en trucha arco iris (*O. mykiss*) y en salmón chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*) (Alvarado *et al.*, 1990). La especie más susceptible a presentar piscirickettsiosis sería el salmón coho (*O. kisutch*) (Smith *et al.*, 1996a).

En Chile, dada la aparente especificidad de la infección frente al salmón coho (*O. kisutch*), se comenzó a disminuir la producción de esta especie

favoreciendo el aumento del número y densidad en la producción de salmón del Atlántico (*S. salar*) y trucha arco iris (*O. mykiss*), lo que evidenció la susceptibilidad a piscirickettsiosis en estas dos especies (Alvarado *et al.*, 1990).

De acuerdo a estudios, queda en evidencia que tanto en condiciones naturales como experimentales, se ha establecido que todas las especies de salmonídeos cultivados en Chile son susceptibles de infectarse y presentar la enfermedad (Larenas *et al.*, 1998).

Esta enfermedad ha sido descrita principalmente en agua de mar, estuarina y muy ocasionalmente en agua dulce, presentándose las epizootias especialmente en otoño y primavera cuando las temperaturas oscilan entre 9-16 °C (Larenas, *et al.*, 1998).

Estudios de Larenas *et al.* (1997) sugieren que el efecto de la densidad poblacional y de la temperatura del agua pueden ser factores importantes en la presentación de la piscirickettsiosis. Los resultados de esta investigación demostraron mortalidades de 24% en un grupo mantenido a 14°C y con una densidad poblacional de 20 k/m³. El resto de los grupos experimentales, los cuales no superaron el 2% de mortalidad, se desafiaron en temperaturas de 8 y 18°C, y densidad de 5 k/m³. Esto último demuestra un efecto de sinergismo entre la temperatura de 14°C y la densidad poblacional de 20 k/m³ para desarrollar la enfermedad.

Los signos más característicos de la piscirickettsiosis son letargia, anorexia, nado errático, acumulación de los peces en las esquinas de las jaulas, descamación y oscurecimiento de la piel (Larenas *et al.*, 1995).

Los salmones afectados presentan niveles en su hematocrito que revelan una severa anemia (Bravo y Campos, 1989). Los niveles de hematocrito bajan hasta 2%, con promedios de 18,5%, cuando los valores normales varían entre

35-50%. Además, se evidencian un gran número de macrófagos en la sangre periférica. Los eritrocitos observados era típicamente normocítico-normocrómico (Cvitanich *et al.*, 1991).

Algunos peces presentan lesiones en la piel similares a pequeñas manchas blancas que van desde pequeñas áreas de levantamientos, a menudo hemorrágicas, de 0,5 cm de diámetro hasta úlceras hemorrágicas de hasta 2 cm o más de diámetro. Algunos peces afectados no evidencian lesiones en la piel (Branson y Nieto, 1991).

Al examen anatomopatológico se observa renomegalia, hepatomegalia y esplenomegalia, además se encuentran hemorragias petequiales en las vísceras y en la vejiga natatoria. En peces afectados por la forma crónica de la enfermedad se han descrito focos blanquecinos en la superficie y parénquima del hígado (Schäfer *et al.*, 1990; Branson y Nieto, 1991; Cvitanich *et al.*, 1991; Larenas *et al.*, 1995).

Se ha observado, además, meningitis, endocarditis, peritonitis, pancreatitis y branquitis, acompañado de cambios vasculares similares a los presentes en el hígado y órganos hematopoyéticos. El ovario también puede estar implicado en algunas infecciones (Cvitanich *et al.*, 1991). Últimamente, se ha aislado *P. salmonis* del cerebro de salmones coho en Chile y se ha propuesto que la conducta de nado errático que frecuentemente tienen los peces infectados sería por causa de la bacteria (Skarmeta *et al.*, 2000).

La principal ruta de transmisión sería la horizontal, que se ve favorecida por el estrecho contacto entre los peces y la densidad poblacional de los cultivos, siendo estos, más susceptibles a las 6 a 12 semanas de ingresados al mar. Experimentalmente se ha observado que el agente es eliminado mediante las heces, orina y bilis (Larenas *et al.*, 1998).

Estudios de Lannan y Fryer (1994) muestran la gran supervivencia de *P. salmonis* en agua marina, detectando partículas infecciosas hasta 10-15 días después de la infección, además, demostraron *in vitro* una baja viabilidad de *P. salmonis* en agua dulce.

A pesar del predominio de brotes de la enfermedad durante la fase marina, Almendras *et al.* (1997), demostraron, bajo condiciones experimentales, transmisión horizontal en agua dulce de peces sin contacto directo, esto se debería a que *P. salmonis* podría sobrevivir largo tiempo en heces, esto agregado a la conducta coprofágica de los peces, aumentaría el riesgo de contagio. Otra forma de transmisión por esta vía, es la ingestión de la bacteria rodeada de restos celulares, esto último, protegería al patógeno del medio hipotónico del agua dulce (Almendras *et al.*, 1997).

Se ha comprobado la presencia de *P. salmonis* en el parásito hematófago *Ceratomyxa gaudichaudii* y en el ectoparásito *Caligus sp.*, lo cual señala que podrían actuar como eventuales vectores o reservorios marinos del agente y en especies acuáticas. Mediante el uso de anticuerpos policlonales contra *P. salmonis* utilizando la técnica de inmunofluorescencia indirecta, se ha detectado positividad en cabrilla, jurel, choritos, picorocos, copépodos de vida libre y poliquetos, sin embargo, la participación que puedan cumplir estas especies en la diseminación y transmisión del agente aún no ha sido dilucidada (Larenas *et al.*, 1998).

Smith *et al.* (1998) demostraron en forma experimental que esta bacteria puede incluso penetrar por la piel y branquias sin lesiones y en ausencia de vectores, además se demostró que la inoculación subcutánea producía elevadas mortalidades lo que sugiere que los ectoparásitos podrían facilitar la transmisión horizontal del agente.

Estudios de Almendras *et al.* (1997), observaron dos patrones de presentación de la enfermedad; peces inoculados vía oral y por branquias, desarrollaban presentación hematológica, que mediante los grandes vasos sanguíneos infectan el parénquima de varios órganos. La otra vía observada es serosa-capsular, que es más característica de infecciones producidas por inyecciones intraperitoneales con la bacteria. La ruta oral cobraría especial importancia cuando cambian de agua dulce al mar, ya que al ser transferidos, los “smolts” ingieren gran cantidad de agua para tener un balance osmótico. Otro antecedente importante es que la bacteria causaría inmunosupresión, promoviendo la infección secundaria con otros patógenos.

Otra vía de transmisión, sería la vertical, pues se ha logrado la infección al estado de ojo (ova fecundada), provenientes de reproductores machos y/o hembras inoculadas intraperitonealmente con el agente. El agente fue demostrado tanto en fluido seminal y ovárico, así como en el interior de espermios y ovas no fertilizadas. De acuerdo con los resultados obtenidos, se comprueba que ya sea el macho o la hembra portadores de *P. salmonis*, pueden transmitir el agente a su prole (Larenas *et al.*, 1996a).

Larenas *et al.* (2003) demostraron experimentalmente que *P. salmonis* puede penetrar a la ova durante el proceso de fertilización, en este estudio se demostró que reproductores machos y hembras inoculados intraperitonealmente con la bacteria, generan alevines de saco infectados viables. En esta misma investigación, mediante la observación de la bacteria sobre la ova, por medio de microscopía electrónica de barrido, se detectaron prolongaciones bacterianas que permitían la adhesión de la bacteria a la ova. Estas prolongaciones se denominaron complejo de adhesión piscirickettsial (CAP) y tienen un máximo de 2,5 µm, detectándose entre microorganismos formando una estructura como panal de abeja. La capacidad de *P. salmonis* para

adherirse a la ova, para luego penetrarla, fue demostrada en este estudio y se sugiere como posible mecanismo de transmisión vertical. Recientemente, estudios de Silva *et al.* (2007), demostraron en forma experimental que tanto las ovas de salmón del Atlántico (*S. salar*) como las de trucha arco iris (*O. mykiss*) son susceptibles a la infección por parte de las cepas LF-89 y SLGO-95 de *P. salmonis*, anteriormente se había demostrado por Larenas *et al.* (2003) sólo en muestras de trucha arco iris (*O. mykiss*) con la cepa LF-89.

3.- Control

Como medidas de prevención para aminorar la cantidad de brotes en los centros de cultivos se pueden mencionar disminución de las densidades poblacionales en las jaulas, bajar las medidas de manejo para evitar el estrés en los peces, extracción de los peces enfermos y muertos lo más pronto posible debido a la eliminación del agente por las vías antes mencionadas (Larenas *et al.*, 1998; Larenas *et al.*, 2000).

De acuerdo a los resultados obtenidos por Larenas *et al.* (1996a), se comprueba que reproductores infectados con *P. salmonis*, tanto machos como hembras, pueden transmitir este agente a su progenie. Esto último indica la importancia de muestrear tanto machos como hembras durante los procedimientos de control de la pisciricketiosis.

Observando ovas infectadas mediante transmisión vertical con *P. salmonis*, se observa este microorganismo dentro del vitelo de la ova. Debido a esto, las medidas de desinfección de ovas serían ineficaces para la eliminación del patógeno (Larenas *et al.*, 1996a).

Frente a los primeros brotes de la enfermedad la bacteria presentó sensibilidad a numerosos antibióticos, siendo sólo resistente a la penicilina

(Fryer *et al.*, 1990), sin embargo, en la actualidad las terapias con antibióticos vía oral o inyectable son inconsistentes y en general no han sido capaces de controlar la enfermedad de forma efectiva, debido en parte a la naturaleza intracelular de *P. salmonis*. Además, estudios han sugerido una posible generación de resistencia de algunas cepas frente a distintos quimioterápicos utilizados para el tratamiento de la piscirickettsiosis (Smith *et al.*, 1996b).

Las medidas preventivas hasta el momento no han evitado brotes, ni la erradicación en zonas endémicas y por ello la elaboración de una vacuna eficaz es quizás la mayor esperanza en este tema (Smith *et al.*, 1995). Por esto representa un desafío para nuestro país, hacer frente a esta enfermedad debido a su importancia económica. Sin embargo, faltan mayores investigaciones en relación a la respuesta inmunoprotectiva que las vacunas pueden generar debido a las variaciones genéticas y antigénicas de *P. salmonis* (Smith *et al.*, 1997).

La respuesta inmune de los salmones contra infecciones con *P. salmonis* permanecen sin ser totalmente comprendidas, la respuesta humoral mediante infecciones naturales o experimentales contra *P. salmonis* es débil (Fryer y Hedrick, 2003). Sin embargo, estudios de Smith *et al.* (1997), mediante radioinmunoensayo determinaron una elevación moderada, de los niveles de anticuerpos circulantes en peces vacunados, desafiados en forma experimental, así como en peces naturalmente infectados.

Estudios de Kuzyk *et al.* (2001) han detectado anticuerpos contra esta bacteria en el suero de peces convalecientes, estos anticuerpos han reaccionado con varios antígenos, incluyendo la lipoproteína OspA y han desarrollado una vacuna recombinante preparada con el antígeno OspA solo o adherido con epítopos de células T de toxina tetánica y proteínas fusionadas de sarampión, que se adicionan para optimizar la eficacia de la

vacuna OspA, demostrando tener un alto nivel de protección (Mauel y Miller, 2002; Fyer y Hedrick, 2003).

Actualmente, existen ocho vacunas con diferente espectro antigénico para uso en salmonídeos, que están disponibles en el mercado nacional y que están autorizadas por el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG), entre ellas hay algunas vacunas unitarias, triples y cuádruples (SAG, 2007).

4- El diagnóstico y sus dificultades

Una aproximación inicial para detectar la piscirickettsiosis es mediante los signos clínicos, aunque generalmente son inespecíficos y sólo sirven como guía para exámenes posteriores patológicos. Es necesaria una detallada observación macroscópica del salmón, análisis de necropsia, visualización de lesiones histopatológicas tales como necrosis e inflamación que pueden presentarse en todo el organismo, pero especialmente en las células adyacentes a los vasos sanguíneos, en las branquias se observa con frecuencia hiperplasia epitelial multifocal que resulta en una fusión laminar de éstas. La bacteria se encuentra habitualmente al interior de macrófagos, hepatocitos y libres en la sangre (Mauel y Miller, 2002).

El agente etiológico se puede detectar mediante el uso de tinciones, de frotis de tejido con, Gram, Giemsa, naranja de acridina y azul de toluidina (Fryer *et al.*, 1990). Con la tinción de Giemsa, estos microorganismos presentan basofilia y se observan de color azul oscuro (Fryer *et al.*, 1990). La técnica de tinción con azul de toluidina permite que la bacteria se presente con un color azul más intenso que los tejidos favoreciendo su localización dentro de éstos (Larenas *et al.*, 1995). También se utiliza la tinción con naranja de acridina, que ofrece un mayor grado de contraste si la comparamos con

Giemsa o Gram y donde la bacteria se observa bajo el microscopio de fluorescencia presentando un color naranja-rojizo brillante, lo que permite su fácil diferenciación del material contaminante conocido como “background” (restos celulares y del microorganismo) y aún cuando un bajo número de microorganismos están presentes en la muestra (Lannan y Fryer, 1993). Además, la bacteria se puede detectar con la tinción de Pinkerton, donde la bacteria se observa fucsia (Fryer *et al.*, 1990; Fryer *et al.*, 1992).

Estas técnicas son adecuadas para la identificación inicial de rutina, ya que tienen la ventaja de ser rápidas y de fácil aplicación, sin embargo son poco específicas y requieren de una posterior confirmación (Lannan *et al.*, 1991).

La replicación de la bacteria no ha sido posible en un medio libre de células, sólo crece *in vitro* en cultivos celulares de especies salmonídeas sin antibiótico (Fryer *et al.*, 1992).

El aislamiento es realizado a partir de la inoculación de muestras de tejido, en especial el renal, proveniente desde peces infectados. Este método es el más concluyente para la detección de *P. salmonis* (Fryer *et al.*, 1990; Cvitanich *et al.*, 1991), sin embargo, dado que se usan cultivos celulares sin antibióticos para permitir el crecimiento normal de *P. salmonis*, como método rutinario de diagnóstico no sería recomendable, debido a la facilidad de su contaminación (Lannan *et al.*, 1991).

Una vez removidas las muestras asépticamente, deben ser mantenidas a 4°C y no ser congeladas, puesto que, estos microorganismos son sensibles tanto a temperaturas elevadas como de congelación. Para efectos del aislamiento, los tejidos deben ser homogenizados en medio de cultivo o en solución salina balanceada y son inoculados en cultivos celulares CHSE-214 (“chinook salmon embryo”) o en EPC (“epithelioma papulosum cyprini”). La

incubación del cultivo celular se realiza a 15-18°C por 28 días y se observa diariamente la aparición de efecto citopático que se caracteriza por ser similar a placas de racimos de células redondeadas, por lo tanto, los cultivos celulares deben ser mantenidos por ese lapso antes de ser considerados negativos (Fryer *et al.*, 1992; Fryer y Hedrick 2003).

Debido a la naturaleza intracelular del patógeno, resulta de un alto costo y difícil obtener antígenos purificados destinados a estudios de caracterización molecular o preparación de vacunas, ya que al separarlas de sus células hospederas se inestabilizan y se dañan durante el proceso de purificación (Kuzyk *et al.*, 1996). Las bacterias intracelulares a menudo son liberadas incompletamente de las células, puesto que se ha demostrado mediante microscopio de barrido que *P. salmonis* se adhiere fuertemente al material de la célula hospedera (Barnes *et al.*, 1998). Las inherentes dificultades asociadas a la investigación de esta bacteria, hacen que el establecimiento de un efectivo protocolo de purificación para *P. salmonis* sea esencial (Kuzyk *et al.*, 1996).

El empleo de herramientas diagnósticas como, la microscopía electrónica de transmisión y de barrido, también se ha usado como método para la identificación y caracterización de *P. salmonis* (Fryer *et al.*, 1990; Cvitanich *et al.*, 1991; Kuzyk *et al.*, 1996). Sin embargo, la observación del agente a través de microscopía electrónica plantea una serie de inconvenientes como método diagnóstico. Es una técnica cara, no es posible pensar su utilización en forma masiva, consume una gran cantidad de tiempo y no permite una fácil diferenciación de *P. salmonis* de otros microorganismos de morfología similar (Mauel *et al.*, 1996). Solamente se reserva su uso con fines de investigación (Fryer *et al.*, 1990).

Yuksel *et al.* (2001), observaron por primera vez un bacteriófago infectando a *P. salmonis* en algunos aislamientos. Estas fago-partículas tenían

forma poliédrica con una cola rígida adherida al vértice del poliedro, con diámetro del fago entre 110 a 130 nm. El microscopio electrónico de transmisión demostró que las fago-partículas estaban dentro de *P. salmonis* y también unidas a las paredes celulares por la punta de la cola y aparentemente con lisis de la células hospederas. El uso de bacteriófagos como control biológico contra enfermedades de peces de cultivo ha despertado mucho interés en los últimos años, especialmente desde que no han sido asociados a efectos residuales o a toxicidad de drogas con este tipo de terapia. El control es basado, primero, en el hecho que el bacteriófago es apto para impedir el desarrollo de la bacteria y, segundo, la infección con el bacteriófago es muy específico para su hospedero. Sin embargo, las dificultades potenciales asociadas con la terapia de fagos necesitan ser consideradas. Por ejemplo, es necesario entender la heterogeneidad y la ecología del fago y de la bacteria, y ser capaz de seleccionar fagos altamente virulentos contra la bacteria objetivo. Es también importante establecer si la cadena bacteriana se hace resistente al fago, y entender cuales de los factores de la respuesta inmune de los hospederos vertebrados son idóneos para activar los fagos y destruir las bacterias (Yuksel *et al.*, 2001).

El método de inmunofluorescencia indirecta desarrollado por Lannan *et al.* (1991), es en la actualidad uno de los más sensibles y específicos para el diagnóstico de la piscirickettsiosis. Esta técnica ha sido modificada debido a los elevados tiempos de incubación de los anticuerpos, mediante el uso del horno microondas, al que se le añade suficiente hielo para evitar el calentamiento y la deshidratación de la muestra. Esta modificación logra disminuir marcadamente los tiempos de incubación del primer y segundo anticuerpo, sin variar la especificidad y sensibilidad (Larenas *et al.*, 1996b). Además de la técnica de inmunofluorescencia, se utiliza para la confirmación el

método de inmunohistoquímica (Alday-Sanz *et al.*, 1994). La técnica de la inmunohistoquímica tiene el inconveniente de añadir mayores etapas a las ya necesarias para el desarrollo de la técnica de inmunofluorescencia, sin embargo, el revelado de la muestra permanece, lo que no es así en la prueba de inmunofluorescencia indirecta realizados sobre frotis en el cual la emisión fluorescente se agota en un corto lapso de tiempo (Alday-Sanz *et al.*, 1994).

Se han desarrollado por laboratorios comerciales, dos técnicas de ELISA para detectar antígenos con el fin de diagnosticar *P. salmonis* a partir de muestras renales (Larenas *et al.*, 1998). Pruebas como éstas suelen ser atractivas por ser rápidas y por procesar una gran cantidad de muestras en un breve lapso, lamentablemente sus resultados no fueron satisfactorios, además, no presentan una prueba referencial previamente validada, por lo tanto, no permiten determinar si entregan resultados fidedignos (Díaz, 1999). Últimamente se ha desarrollado otro ELISA, para la detección y cuantificación de *P. salmonis* a partir de muestras renales con el cual se han obtenido esperanzadores resultados pues utilizan anticuerpos monoclonales específicos contra la bacteria (Aguayo *et al.*, 2002).

La reacción de polimerasa en cadena (PCR) para la detección de *P. salmonis* fue desarrollada por Mauel *et al.* (1996). Esta técnica permitiría la detección del agente en etapas tempranas de la infección, cuando pocas bacterias están presentes o desde peces asintomáticos que pueden actuar como portadores y escapar a los métodos tradicionales de identificación del patógeno. El proceso de preparación del tejido, aislamiento del ADN y visualización de los productos generados tiene una duración de uno a dos días, lo que es considerable menor al tiempo demandado en el aislamiento del agente. Además, permite realizar la diferenciación entre las distintas cepas de *P. salmonis*. La sensibilidad y especificidad de esta prueba diagnóstica es altísima,

pudiendo incluso llegar a detectar hasta 1 dosis infectante de cultivo de tejido (TCID₅₀) (Mauel *et al.*, 1996). El método de PCR requiere equipamiento especializado y el costo de esta prueba podría ser prohibitivo para exámenes de chequeo rutinarios, pero es una muy buena herramienta para la aproximación, confirmación e investigación de esta bacteria (Mauel y Miller, 2002).

Acercas de las características genéticas y antigénicas de la bacteria, se ha observado una pequeña variación genética entre varios aislamientos de *P. salmonis* de diferentes especies de salmones o de diversas locaciones geográficas. Datos de secuencia del gen 16S rRNA están disponibles para cinco aislamientos de *P. salmonis*, representativos de tres especies de huéspedes salmonídeos y tres regiones geográficas ampliamente separadas de Norte América, Sudamérica y Europa, demostrando tener secuencias similares (Fryer y Hedrick, 2003).

Los antígenos de *P. salmonis* de importancia potencial en el desarrollo de vacunas, han sido identificados por el uso de anticuerpos policlonales y monoclonales y por sus reacciones con el suero de salmones convalecientes (Fryer y Hedrick, 2003).

Se han realizado varios estudios acerca de la caracterización de antígenos y anticuerpos; Kuzyk *et al.* (1996), identificaron seis antígenos predominantes, cuatro de origen proteico y dos con características de carbohidratos. Para identificar los antígenos, se usó suero de conejo inmunizado con la bacteria completa de *P. salmonis*, que debió ser altamente purificada para aminorar la reacción cruzada con restos celulares de la línea de cultivo celular. Además, para determinar los antígenos para los cuales el hospedero natural de *P. salmonis* genera una respuesta humoral, se hicieron pruebas con suero de salmonídeos convalecientes. Los salmones infectados no mostraron una fuerte

respuesta humoral contra el patógeno intracelular, el suero de conejo inmunizado tuvo una reacción más intensa, reconociendo a un mayor número de proteínas que el suero de salmones convalecientes, además los antígenos inmunoreactivos reconocidos con suero policlonal de conejo se detectaron como de superficie, difiriendo significativamente de los identificados con suero de salmones.

Barnes *et al.* (1998), usando una técnica distinta de purificación de *P. salmonis*, reconocieron ocho proteínas bacterianas, tres de ellas tuvieron una fuerte reacción con el suero policlonal de conejo y parecen ser los antígenos inmunodominantes, por lo menos para los conejos. Debido a que el suero policlonal fue preparado contra *P. salmonis* cultivada en CHSE-214 con poca purificación, no es sorprendente que varios antígenos de cultivos no infectados de CHSE-214 también reaccionaran positivamente en las pruebas. La explicación más probable de las diferencias entre el estudio de Kuzyk *et al.* (1996) y el de Barnes *et al.* (1998) sería por los distintos métodos de purificación bacteriana (Barnes *et al.*, 1998).

Estudios de Jones *et al.* (1998) con organismos similares a *P. salmonis*, que usualmente no son patógenos en animales acuáticos, observaron alta mortalidad con reconocimiento de nueve proteínas y múltiples estructuras no proteicas, reconocidas por suero policlonal y monoclonal, lo que indicaría, por su virulencia y características antigénicas, debería ser considerada un subtipo o variante genética de *P. salmonis*. La mayoría de los organismos similares a *P. salmonis* acuáticos están genética, bioquímica y serológicamente indefinidos.

Usando una fracción purificada de la bacteria, Jamett *et al.* (2001), produjeron un panel de veintiocho anticuerpos monoclonales contra *P. salmonis*, para determinar la especificidad hacia el patógeno, se realizó un ensayo de ELISA e inmunofluorescencia indirecta. Se seleccionaron seis

anticuerpos según su fuerte reacción contra la bacteria y por no producir reacciones cruzadas con otros patógenos comunes en los peces. Los problemas por reacciones cruzadas producen una baja especificidad y los laboratorios que poseen pruebas basadas en anticuerpos policlonales no obtienen un resultado óptimo, como así lo han descrito en otro estudio Barnes *et al.* (1998). En el estudio de Jamett *et al.* (2001), para obtener los anticuerpos monoclonales, se utilizó la tecnología del hibridoma. La gran ventaja de ésta es la disección de la respuesta humoral del animal experimental en cada uno de los componentes y seleccionar los anticuerpos monoclonales con alta especificidad contra los antígenos del agente patógeno de una enfermedad particular. Esta tecnología facilita la búsqueda de anticuerpos que no producen reacción cruzada con otros patógenos similares y con células del cultivo, o anticuerpos que reaccionan con estructuras antigénicas únicas que están pobremente representadas en la superficie de la bacteria (Jamett *et al.*, 2001).

La producción de hibridoma se realiza obteniendo células esplénicas de un ratón previamente inmunizado con *P. salmonis*, estas células se aíslan y se fusionan con células de mieloma de ratón, los hibridomas son seleccionados por un ELISA directo y por inmunofluorescencia indirecta, los hibridomas específicos para *P. salmonis* son clonados por técnica de dilución limitante, para luego purificar los anticuerpos producidos. Algunos inmunoensayos basados en monoclonales han sido exitosos para la determinación de patógenos en peces. Los anticuerpos monoclonales exhiben buena inmunoreactividad con *P. salmonis*, simplifican la calidad de controles por el mantenimiento de sus propiedades en todo momento y por la disponibilidad de cantidades ilimitadas de anticuerpos homogéneos (Jamett *et al.*, 2001).

5.- Prueba de ELISA indirecto

La prueba de ELISA constituye una técnica inmuno-diagnóstica muy versátil que presenta sencillez, rapidez, eficacia y entrega la posibilidad de obtener un resultado cuantificable, no requiere un equipamiento demasiado complejo para su implementación en el laboratorio, permitiendo el análisis de un gran número de muestras en un corto lapso de tiempo (Voller y Bidwell, 1986).

Una forma de diagnosticar la infección es mediante la detección de anticuerpos, para esto hay que considerar que los salmones infectados no desarrollan una respuesta humoral fuerte contra *P. salmonis* (Kuzyk *et al.*, 1996). Sin embargo, Nielsen *et al.* (1996), establecen las cantidades de anticuerpos detectables por un sin número de pruebas, siendo las más sensibles aquellas basadas en enzimoimmuno ensayos, lo que abre posibilidades de detectar mínimas cantidades de anticuerpos. El método de ELISA indirecto es una técnica altamente sensible para determinar la presencia de anticuerpos, siendo capaz de detectar cantidades de hasta 5 ng/mL de anticuerpos (Nielsen *et al.*, 1996).

En términos generales la prueba de ELISA indirecta para la detección de anticuerpos se realiza cubriendo con una capa de solución de antígenos pequeños pozos preformados en placas de poliestireno. Los antígenos pueden ser de origen polisacárido, lipopolisacárido y proteico, estos últimos tienen un considerable beneficio, ya que se unen con firmeza a este material. Luego se agrega a estos pozos el suero, de manera que los anticuerpos específicos del suero puedan unirse al antígeno que se mantiene fijo a las paredes. Después de la incubación y de lavado para extraer el anticuerpo no unido, la presencia de los anticuerpos que se unieron se puede detectar agregando una inmunoglobulina ligada químicamente a una enzima. Este complejo se une a

los anticuerpos y, después de la incubación y del lavado, se detecta y se mide con sólo agregar el sustrato para la enzima correspondiente. La intensidad del color será proporcional a la cantidad de antiglobulina ligada a la enzima que se haya captado, la cual, a su vez, será proporcional a la cantidad de anticuerpos presentes en el suero. La intensidad del color se estima a simple vista o, aun mejor, mediante espectrofotometría (Tizard, 1998).

El bloqueo de las placas es una herramienta que es altamente recomendado, ya que disminuye las interacciones no específicas de materiales con la matriz, saturando todos los sitios disponibles en la matriz. En la técnica de ELISA indirecto, el bloqueo se realiza posterior a la adhesión del antígeno a la placa. La solución de bloqueo es usualmente una molécula proteica pequeña como gelatina, albúmina o caseína (Nielsen *et al.*, 1996).

Con respecto a las características de los anticuerpos y antígenos, se puede señalar que las inmunoglobulinas son proteínas globulares que tienen predisposición a ser adherentes y a interactuar no específicamente entre ellas y con el antígeno. Esto puede conducir a interpretaciones de reacciones falso positivas. Sin embargo, la adición de detergentes y otros químicos que reducen la tensión superficial, elimina algunas de las reacciones no específicas (Nielsen *et al.*, 1996).

Muchas de las células bacterianas han demostrado tener receptores o proteínas ligadoras de inmunoglobulinas en su superficie. Este tipo de reactividad también puede guiar a interpretación de falsos positivos en los resultados. Por eso, el uso de células enteras como antígenos es menos deseable que materiales aislados de la célula. Las pruebas de ELISA pueden usar las dos opciones, ya sea células intactas o fraccionadas, aunque estas últimas eliminan problemas de reactividad indeseada (Nielsen *et al.*, 1996).

Es importante señalar que la interacción antígeno-anticuerpo es una interacción química. Por esta razón, cuando se trata de optimizar la interacción es importante considerar la temperatura, pH, fuerzas iónicas, tiempo y aspectos físicos de los reactantes (Nielsen *et al.*, 1996).

Con respecto a la adhesión antigénica, se puede comentar que la adhesión pasiva es principalmente a través de vínculos hidrofóbicos y es el método más frecuentemente usado en la inmovilización antigénica a la matriz. Los acoplamientos covalentes pueden ser realizados con el uso de plásticos especiales y provee un vínculo más fuerte, especialmente de proteínas a la placa (Nielsen *et al.*, 1996).

La selección de la matriz influye en la eficiencia y en el costo de la prueba. Un gran número de distintos plásticos se han usado, pero el poliestireno es el más frecuente (Nielsen *et al.*, 1996).

Para la detección de anticuerpos, ya sean monoclonales o policlonales, las inmunoglobulinas han sido extensivamente usadas. Estos heterogéneos reactivos van desde verdaderas antiglobulinas hasta anticuerpos específicos isotópicos. Los más frecuentemente usados son anti-IgG (de cadenas específicas pesadas y livianas) preparadas en especies heterólogas por inmunización con moléculas intactas de IgG purificadas de especies de interés.

Estas moléculas anti-IgG se conjugan generalmente con enzimas. En el uso de inmunoensayos, varias enzimas han sido reportadas, como ventajas se puede decir que son seguras y estables. Las enzimas más comúnmente usadas son peroxidasa, obtenida de rábano picante y fosfatasa alcalina, sumando un 90% de usos reportados (Nielsen *et al.*, 1996).

La actividad enzimática es medida con la adición de químicos que producen cambio de color, para cada enzima hay un número de sustratos

disponibles. El peróxido de hidrógeno es, por lo general usado con la enzima peroxidasa. Este sustrato es barato y seguro. Para el desarrollo de color se han usado varios cromógenos, incluyendo el ácido 2,2'- azinobis (3- etilbenzotiazolin-6-sulfónico) [ABTS]. En la reacción enzimática se donan iones de hidrógeno produciendo el cambio de color en el cromógeno y la intensidad de éste es directamente proporcional a la cantidad de reaccionantes antepuestos. El complejo enzima sustrato cromógeno es dependiente del pH y para su máximo desarrollo es necesario usar aquél que provea actividad óptima (Nielsen *et al.*, 1996).

Las cualidades diagnósticas de un ELISA están muy relacionadas con los reactivos utilizados, donde el antígeno y su pureza, y la calidad de los anticuerpos conjugados son claves en su rendimiento. Cuando se desarrollan pruebas de ELISA, Nielsen *et al.* (1996) recomiendan probar varios tipos de placas y tampones de sensibilización para maximizar la capacidad de unión del antígeno.

En una aplicación en la detección de anticuerpos contra *P. salmonis*, un ELISA presentaría dos desafíos importantes. Por un lado, la escasa producción de anticuerpos en los peces, podría ser solucionada por la mayor sensibilidad analítica de este tipo de pruebas. Además, la dificultad de obtención de antígenos muy purificados debido a la naturaleza intracelular de *P. salmonis*, podría ser solucionada utilizando métodos simples de extracción y que han probado dejar disponibles varias estructuras antigénicas de la pared celular de bacterias gramnegativas (Blasco, 1990).

OBJETIVOS

General

Desarrollar una fase sólida para la detección de anticuerpos contra *Piscirickettsia salmonis*.

Específicos

- Preparar el antígeno soluble de *Piscirickettsia salmonis*.
- Adherir este antígeno a una placa de poliestireno para obtener una fase sólida.
- Desarrollar ELISA indirecto para comprobar la calidad de la fase sólida.

MATERIALES Y MÉTODOS

I.- Preparación del antígeno.

Se utilizaron las cepas LF-89 (ATCC VR 1361) (Fryer *et al.*, 1992) y SLGO-95 (Smith *et al.*, 1996a), ambas aisladas desde salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*), que se obtuvieron de la multiplicación en botellas de cultivo celular. Ambas cepas de la bacteria fueron multiplicadas en la línea celular CHSE-214 con medio esencial mínimo (MEM) de Eagle con sales de Earle, libre de antibióticos, incubadas a 18°C, según la metodología establecida por Fryer *et al.* (1990).

El período de multiplicación de la *P. salmonis* se dio por finalizado una vez que se observó un efecto citopático (ECP) cercano al 100%.

Estas bacterias fueron filtradas con un filtro millipore®, con poro de un diámetro de 5 µm y para eliminar restos celulares se realizó una centrifugación liviana a 2.000 x *g* durante 10 min, a 4°C. Se obtuvo el sobrenadante y este se centrifugó a 7.000 x *g* por 1 h 40 min. El “pellet” obtenido fue pesado y luego resuspendido en MEM (Medio Esencial Mínimo).

Para extracción salina del antígeno se utilizaron las recomendaciones de Blasco (1990). Brevemente, las células bacterianas se resuspendieron en solución salina fisiológica (0,9% NaCl) en proporción de 7,5 mL por 1 g de células húmedas. La suspensión fue sometida a 100°C mediante vapor fluyente (autoclave abierta) durante 15 min. Una vez fría, la preparación se centrifugó a 12.000 x *g* durante 15 min a 4°C. El sobrenadante fue dializado durante 6 a 12 h contra agua destilada en volumen de 150 mL/mL de preparación. Se hicieron tres cambios del líquido de diálisis. Posteriormente se eliminó por centrifugación algún precipitado presente en la bolsa de diálisis y el preparado de extracto soluble fue sometido a una ultracentrifugación a 100.000 x *g* a 4°C por 6 h. El sedimento obtenido fue disuelto en aproximadamente 5 mL de

agua destilada y después liofilizado y pesado, para conocer la cantidad de antígeno obtenida. Una vez que se realizó la dilución madre de antígeno en agua destilada correspondiente a 10 mg/mL, se determinó su cantidad de proteínas mediante el método espectrofotométrico de Lowry (Lowry *et al.*, 1951), usando como estándar albúmina sérica bovina.

II.- Establecimiento de fase sólida.

Para la adhesión del antígeno soluble a una placa de poliestireno se siguieron las recomendaciones de Collingwood-Selby y Toro (1992), Ábalos *et al.* (1993) y Nielsen *et al.* (1996).

Las condiciones del ensayo fueron las siguientes:

- Se utilizaron las placas de ELISA NUNC Maxisorp y NUNC 69620, que poseen diferente capacidad de adsorción, según el fabricante.
- Se utilizaron dos tampones de sensibilización para la dilución del antígeno correspondientes a PBS pH 7,4 y solución Carbonato-Bicarbonato pH 9,6. El antígeno fue diluido en el tampón de sensibilización en razón de 10 mg/mL y se utilizaron las siguientes diluciones de sensibilización: 1/10; 1/100; 1/500 y 1/1.000 Se consideraron dos temperaturas de sensibilización: 4°C y a temperatura ambiente, durante toda la noche.

III.- Desarrollo del ELISA indirecto

Previo al desarrollo de la fase sólida se procedió a lavar las placas tres veces con PBS 0,002M con Tween 20 al 0,05% y a bloquearlas con leche descremada al 3%, durante 24 h a 4°C. Posteriormente, se procedió con los mismos ciclos de lavados luego de cada incubación.

Los procedimientos de fase líquida se hicieron en agitación constante de las placas y a temperatura ambiente.

Para determinar la magnitud de la adsorción del antígeno soluble preparado se realizó una fase líquida, consistente en la adición de una mezcla de anticuerpos monoclonales murinos específicos contra *P. salmonis* (diluído 1/100) (Bios_Chile). Luego de una incubación de 60 min y un ciclo de lavados se agregó un anticuerpo IgG de cabra anti-ratón conjugado a peroxidasa (Sigma) (probando diluciones de 1/1000, /2.500 y 1/5.000). Al finalizar esta etapa se realizó nuevamente una incubación y ciclo de lavados. Se utilizó una solución de sustrato compuesto por 1 mM de ABTS (ácido [2,2'-azinobis (3-etilbenzo-tiazolinsulfónico)]) (Sigma) y 4,4 mM de H₂O₂ en tampón citrato de sodio/ácido cítrico 0,05 M, pH 4,50 +/- 0,05. La lectura de las placas se realizó en un equipo Immunoskan Plus BDSL, con filtro de 405 nm que entrega lecturas de densidades ópticas.

Con el fin de establecer la mejor alternativa de sensibilización (dilución de antígeno, tipo de placa, tipo de tampón, temperatura de sensibilización y diluciones de conjugado) se utilizó un suero de ratón normal, negativo a *P. salmonis* y la mezcla de monoclonales positiva a *P. salmonis*, los cuales fueron distribuidos en duplicado para cada alternativa de fase sólida.

Las alternativas de sensibilizaciones fueron 8:

Alternativa	Placa	Placa	Tampón	Tampón	T°	T°
	69620	Maxi	pH 7,4	pH 9,6	4°C	Amb.
1		X		X	X	
2		X	X		X	
3		X	X			X
4		X		X		X
5	X			X	X	
6	X		X		X	
7	X		X			X
8	X			X		X

A continuación se presenta el esquema de distribución de sueros en las placas para cada una de estas alternativas.

Diluciones de Antígeno

Diluciones Conjugado	1 / 1		1 / 10		1 / 100		1 / 500		1 / 1.000	
1 / 1.000	s/s	s/s	+	+	+	+	+	+	+	+
	s/s	s/s	-	-	-	-	-	-	-	-
1 / 2.500	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1 / 2.500	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

*S/S= Sin suero, control cultivo celular

Para determinar la mejor alternativa de fase sólida, se obtuvieron los promedios de densidades ópticas (OD) de los duplicados de mezcla de monoclonales positivos y suero negativo a *P. salmonis* y se estableció la siguiente Razón de Adsorción (RA) (Ábalos *et al.*, 1993):

$$RA = \frac{\bar{x} \text{ OD } (+)}{\bar{x} \text{ OD } (-)}$$

Se considera a la alternativa como válida cuando la RA es ≥ 6 y la mejor alternativa es aquella con mayor RA.

RESULTADOS

Las bacterias *P. salmonis* LF-89 y SLGO-95 fueron cultivadas en la línea celular CHSE-214 y 10 días después de la infección cuando se produjo el 100% del efecto citopático, fue confirmada su presencia por medio de inmunofluorescencia.

Las bacterias fueron purificadas mediante filtraciones y centrifugaciones con el fin de eliminar restos celulares. La cantidad de células de *P. salmonis* obtenidas estuvo representada por un peso 1,2 g al inicio del procedimiento de extracción del antígeno.

Posteriormente, se realizó una extracción salina del antígeno según Blasco (1990). Por último, el preparado se ultracentrifugó, se liofilizó y pesó, obteniendo 567 mg de antígeno, que luego se reconstituyó, obteniendo una dilución de 10 mg/ml. De esta última dilución se determinó la concentración de proteínas totales por el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951), usando como estándar albúmina sérica bovina, obteniendo un valor de aproximadamente 0,1 mg/mL.

Se realizaron diluciones de antígeno y de conjugado según lo descrito en material y método, pero no se usaron las diluciones de 1/10.000 de conjugado y 1/2000 de antígeno, debido a la escasa cantidad de anticuerpo anti *P. salmonis* que se poseía.

Durante el desarrollo del ELISA indirecto y con el propósito de ajustar la técnica, en la primera placa se realizó bloqueo de la placa con leche descremada al 2% por 24 h, la segunda no se bloqueó, y en las siguientes se hizo bloqueo al 3% por una hora en agitación constante, esta última demostró ser la mejor opción de bloqueo. El bloqueo de las placas ha demostrado ser

una buena herramienta para evitar una interacción inespecífica de anticuerpos con proteínas contaminantes.

En cada placa de ELISA se dejaron los primeros 4 pocillos con restos de cultivo celular como fase sólida, en vez del antígeno con el objetivo de tener un control, por lo tanto estaban libres de suero positivo y negativo, sí se les agregó conjugado y sustrato.

Se realizaron 14 muestras de ELISA con 2 alternativas de tipos de placas, 2 de tipo de tampón y 2 de temperaturas de sensibilización para determinar la mejor alternativa.

En general, se obtuvieron resultados similares, en donde no se detectó una reacción colorimétrica significativa.

Debido a que no se obtuvo reacción de color en las primeras placas realizadas, se optó por probar aquellas alternativas que podían dar mejores resultados por experiencias previas (placas 69620 y tampón carbonato-bicarbonato pH 9,6, temperatura ambiente). Obteniendo el mismo resultado como lo muestran las densidades ópticas de las dos microplacas siguientes:

		1 / 1		1 / 10		1 / 100		1 / 500		1 / 1000	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1 / 100	A	0.047	0.044	0.083	0.085	0.045	0.043	0.044	0.045	0.042	0.043
	B	0.048	0.042	0.054	0.050	0.058	0.067	0.046	0.047	0.046	0.048
1 / 2500	C	0.048	0.085	0.064	0.057	0.046	0.041	0.040	0.039	0.041	0.039
	D	0.056	0.053	0.047	0.047	0.046	0.045	0.046	0.045	0.045	0.045
1 / 5000	E	0.053	0.073	0.057	0.055	0.055	0.050	0.044	0.046	0.048	0.049
	F	0.059	0.057	0.054	0.051	0.053	0.053	0.054	0.053	0.050	0.050

		1 / 1		1 / 10		1 / 100		1 / 500		1 / 1000	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1 / 100	A	0.053	0.045	0.091	0.087	0.044	0.043	0.044	0.042	0.044	0.042
	B	0.048	0.044	0.052	0.051	0.061	0.063	0.046	0.047	0.046	0.047
1 / 2500	C	0.048	0.090	0.059	0.058	0.046	0.049	0.039	0.040	0.040	0.042
	D	0.058	0.047	0.047	0.048	0.043	0.043	0.044	0.045	0.047	0.044
1 / 5000	E	0.061	0.082	0.062	0.063	0.056	0.053	0.049	0.053	0.051	0.050
	F	0.062	0.061	0.054	0.054	0.058	0.056	0.054	0.056	0.050	0.049

Además, se probó la alternativa de la misma placa y mismo tampón de sensibilización, con distinta temperatura (4°C).

		1 / 1		1 / 10		1 / 100		1 / 500		1 / 1000	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1 / 100	A	0.047	0.044	0.063	0.066	0.046	0.047	0.043	0.041	0.041	0.041
	B	0.045	0.046	0.049	0.047	0.043	0.047	0.042	0.047	0.052	0.043
1 / 2500	C	0.058	0.072	0.051	0.052	0.039	0.041	0.037	0.038	0.039	0.039
	D	0.066	0.051	0.049	0.046	0.042	0.044	0.043	0.043	0.040	0.045
1 / 5000	E	0.061	0.072	0.056	0.058	0.047	0.050	0.048	0.047	0.046	0.046
	F	0.062	0.054	0.056	0.056	0.058	0.056	0.059	0.053	0.054	0.052

		1 / 1		1 / 10		1 / 100		1 / 500		1 / 1000	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1 / 100	A	0.046	0.045	0.073	0.070	0.041	0.048	0.041	0.043	0.042	0.043
	B	0.047	0.041	0.050	0.050	0.041	0.051	0.050	0.048	0.048	0.045
1 / 2500	C	0.042	0.078	0.052	0.053	0.039	0.039	0.040	0.058	0.038	0.040
	D	0.053	0.048	0.046	0.046	0.045	0.045	0.044	0.043	0.046	0.044
1 / 5000	E	0.052	0.065	0.057	0.056	0.050	0.047	0.049	0.048	0.047	0.050
	F	0.058	0.053	0.053	0.054	0.054	0.051	0.055	0.056	0.052	0.053

Sin embargo, estas alternativas tampoco revelaron reacción colorimétrica que sobrepasara una densidad óptica (DO) de 0,100 nm. Solamente en las placas 69620 con tampón pH 9,6 y temperatura ambiental se pudo observar una pequeña diferencia entre las DO de sueros positivos y negativos, en las

diluciones menores de antígeno (1/10) y conjugado (1/1000), que no alcanzó a una RA > de 1,8.

DISCUSIÓN

La obtención de un antígeno de *P. salmonis*, ya sea particulado o soluble, como es el caso de esta memoria, es difícil, lento y de alto costo, como ya lo habían señalado Kuzyk *et al.* (1996) y Barnes *et al.* (1998). Esto se pudo comprobar, pues para obtener una masa celular bacteriana adecuada para iniciar el proceso de obtención del antígeno, se requería al menos de 1 ó 2 g de bacterias. Para esto hubo que realizar varias partidas de cultivos celulares de las dos cepas de *P. salmonis* consideradas (LF-89 y SLGO-95), los cuales además requieren de períodos de al menos 28 días para realizar la cosecha, desde el momento de inicio del crecimiento de la línea celular CHSE-214 hasta que se completa un 100% de efecto citopático. Además, la obtención de bacterias purificadas es compleja y puede no estar exenta de presencia de detritus celular. El procedimiento de filtrado y centrifugado de la cosecha por lo menos asegura una mínima presencia de restos celulares, sin que se dañen las bacterias. Existen protocolos de purificación de cultivos bacterianos que utilizan Percoll (Kuzyk *et al.*, 1996; Yuksel *et al.*, 2001), o diatrizoato meglumine 66% y diatrizoato sódico 10% (DMDS, comercialmente conocido como Hypaque o Renografin) (Barnes *et al.*, 1998), que no fueron utilizados en este trabajo.

El procedimiento utilizado, para realizar la extracción soluble de antígenos de bacterias Gramnegativas como el propuesto por Blasco (1990) es sencillo, rápido y no requiere de gran equipamiento de laboratorio. Este proceso de someter las bacterias al calor fluyente destruye las membranas celulares, expone y libera diversos componentes tanto internos como externos, donde se encuentran proteínas, azúcares y ácidos nucleicos. Ello implica que el producto obtenido puede contener muy diversos tipos de antígenos. En nuestro caso se consideró importante determinar la cantidad de proteína presente, la cual

representaba alrededor del 1% del peso del antígeno liofilizado. Esto significa que el 99% restante puede estar representado por otro tipo de moléculas incluyendo azúcares y ácidos nucleicos. Esto indica que si por este método se quiere obtener una mayor cantidad de proteínas se debe contar con una gran capacidad de cultivo de la bacteria.

Nielsen *et al.* (1996) establecen que para lograr una adecuada adhesión a las placas de poliestireno, especialmente con proteínas, debe trabajarse en diluciones de 1 a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de contenido proteico. En este trabajo, la dilución 1/10 del antígeno que fue la segunda dilución usada, contenía aproximadamente 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de proteína. La dilución menor, 1/1, contenía por lo tanto unos 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de proteína y la mayor alrededor de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, lo cual daba un buen margen de trabajo, ya que existía suficiente cantidad de proteína como para dar una reacción adecuada, sin embargo no se obtuvieron los resultados buscados, probablemente debido a que la mezcla de anticuerpos monoclonales con los cuales se trabajó son específicos para otro tipo de antígenos, especialmente de la superficie de la bacteria. En cambio nuestro preparado antigénico tendría una alta proporción de proteínas citoplasmáticas (Blasco, 1990).

Se seleccionaron los métodos más tradicionales de adherir antígenos solubles a placas de poliestireno basados en Nielsen *et al.* (1996) y en trabajos similares (Collingwood-Selby y Toro, 1992; Ábalos *et al.*, 1993). Las recomendaciones más notables son las de utilizar placas de poliestireno, tampón de sensibilización de carbonato-bicarbonato pH 9,6 e incubaciones de alrededor de 18 h a temperatura ambiente. Sin embargo no se obtuvo el resultado esperado. Se comprobó obviamente que el sistema conjugado-sustrato-cromógeno funcionaba, pues generó un color intenso al mezclar los reactivos. Dentro de las placas realizadas, reconociendo que las densidades

ópticas obtenidas no permiten distinguir diferencias importantes, las mejores relaciones ($RA > 1,7$) se obtuvieron con placas NUNC 69620, tampón carbonato-bicarbonato pH 9,6 y temperatura de incubación ambiental., tal como lo recomienda Nielsen *et al.* (1996).

Una de las aprensiones que inicialmente se tuvo fue que estructuras de las células del cultivo, fuesen a reaccionar inespecíficamente con el conjugado. Se comprobó que en el control donde no se utilizó primer anticuerpo, tampoco hubo desarrollo de color y por lo tanto no había reacción inespecífica.

El no desarrollo de color en las placas probadas, indica por lo tanto que no se produjo la unión del conjugado con el primer anticuerpo. Este primer anticuerpo que corresponde a una mezcla de 6 monoclonales contra *P. salmonis*, por lo tanto no reconoció ninguna estructura antigénica de origen proteico adherida a la placa. Otra posibilidad es que si hubo adhesión de alguna proteína reconocible, ésta se encontrase en una concentración muy baja o que su unión a la placa impidiera la exposición del sitio antigénico específico. Sin embargo, es también probable que la presencia de proteínas adheridas al poliestireno no se correspondiese antigénicamente con alguno de los 6 anticuerpos monoclonales utilizados. Estos monoclonales están dirigidos preferentemente contra antígenos de superficie de la bacteria (Jamett *et al.*, 2001), pues han sido preparados frente a la bacteria completa y nuestro antígeno soluble contiene probablemente una mayor cantidad de proteínas del citosol de la bacteria. Es probable que un anticuerpo policlonal pudiese contener inmunoglobulinas que reconozcan una mayor cantidad de sitios antigénicos proteicos, aunque tenga la desventaja de reacciones inespecíficas, disminuyendo la especificidad de la prueba. Estudios posteriores, quizás se debieran desarrollar con mezclas de mayor cantidad de anticuerpos

monoclonales, ya que al ser la bacteria de difícil obtención y purificación se necesitan más posibilidades de adherencias.

Otro aspecto a considerar es la centrifugación realizada a 7.000 x *g*, lo más probable es que, a pesar de que se realizó por 1h 40 min, no fue suficiente para concentrar una mayor cantidad de bacterias en el “pellet”, ya que resultados de Silva (2007) confirmaron baja concentración bacteriana en las muestras después de centrifugaciones a 11.427 x *g* por 60 min. Esto se puede deber a rupturas bacterianas y/o a pérdidas de antígenos bacterianos desde la bacteria a la suspensión, que se explicaría por la posible presencia de tamaños bacterianos con bajo peso molecular, lisis bacteriana y/o efectos mecánicos. Fryer *et al.* (1990), observaron una gran variedad de tamaños en que se puede presentar esta bacteria (0,5 a 1,5 μm). Basándose en lo anterior, pudo existir una presencia importante de bacterias de pequeño tamaño y bajo peso molecular que se detectaron en el sobrenadante después de la centrifugación a 7.000 x *g*. Además de esto, la lisis bacteriana por causas físicas o químicas, durante el proceso de utilización y conservación de muestra, pudo liberar antígenos que quedaron en la fracción del sobrenadante. En futuros trabajos, para optimizar la concentración de la bacteria, se podría aumentar la velocidad y tiempo de la segunda centrifugación.

Como último comentario, se puede decir que no podemos asegurar que exista una adhesión de alguna proteína a las placas y que ello podría ser causa del no desarrollo de color en la reacción. Esto último es poco probable pues el protocolo asegura una buena adhesión, no así de la proteína específica capaz de ser detectada por la mezcla de monoclonales.

CONCLUSIONES

- Se confirma que la bacteria, *Piscirickettsia salmonis*, al ser de naturaleza intracelular, requiere el uso complejos procedimientos de cultivo y purificación que son de alto costo y demandan mucho tiempo.
- No fue posible comprobar la adhesión del antígeno a la placa, ya que bajo ninguno de los procedimientos se obtuvo un desarrollo de color correspondiente a reacción antígeno-anticuerpo.
- No fue posible establecer una fase sólida para la detección de los anticuerpos disponibles contra *Piscirickettsia salmonis*.

BIBLIOGRAFÍA:

ÁBALOS, P.; PINOCHET, L.; FÁBREGA, F. 1993. Desarrollo de una prueba de ELISA para descartar respuestas postvacunales con Cepa 19, utilizando un antígeno soluble polisacárido de *Brucella abortus* 1119-3. Av. Cienc. Vet. **8**(2):138-143.

AGUAYO, J.; MIQUEL, A.; ARANKI, N.; JAMETT, A.; VALENZUELA, P.; BURZIO, L. 2002. Detection of *Piscirickettsia salmonis* in fish tissues by an enzyme-linked immunosorbent assay using specific monoclonal antibodies. Dis Aquat. Org. **49**:33-38.

ALDAY-SANZ, V.; RODGER, H.; TURNBULL, T.; ADAMS, A.; RICHARDS, R.H. 1994. An immunohistochemical diagnostic test for rickettsial disease. J. Fish Dis. **17**:189-191.

ALMENDRAS, F.E; FUENTEALBA, I.C.; JONES, S.R.M; MARKHAM, F.; SPANGLER, E. 1997. Experimental infection and horizontal transmisión of *Piscirickettsia salmonis* in freshwater-raised Atlantic salmon, *Salmo salar* L. J. Fish Dis. **20**: 409-418.

ALVARADO, V.; SCHÄFER, J.W.; ENRÍQUEZ, R.; MONRÁS, M.; CUBILLOS, V.; FARÍAS, C.; ALBERDI, A. 1990. Síndrome del salmón coho (S.S.C.) nueva enfermedad de salmonídeos cultivados en fase de agua de mar en Chile. Situación actual. Patología Animal. **4**:10-13.

ANÓN. 2000. Larga vida al salmón. [en línea]. Bioplanet. Marzo- Abril. <http://www.bioplanet.net/magazine/bio_marabr_2000/bio_2000_marabr_reportaje.htm> [consulta: 16-03-2004].

BARNES, M.; LANDOLT, M.; POWELL, D.; WINTON, J. 1998. Purification of *Piscirickettsia salmonis* and partial characterization of antigens. Dis. Aquat. Org. **33**:33-41.

BLASCO J.M. 1990. *Brucella ovis*. **In:** Animal Brucellosis. Nielsen K. and Duncan J.R. Eds. CRC Press. Boca Raton, Florida. USA. pp 351-378.

BRANSON, E.J.; NIETO DIAZ-MUÑOZ, D. 1991. Description of a new disease condition occurring in farmed coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*, in South America. J. Fish Dis. **14**(2):147-156.

BRAVO, S.; CAMPOS, M. 1989. Síndrome del salmón coho. Chile Pesquero. **54**:47-48.

COLLINGWOOD-SELBY, A.; TORO, H. 1992. Virus Bronquitis Infecciosa Aviar unido a fase sólida para detección de anticuerpos específicos en pruebas de ELISA. Av. Cienc. Vet. **7**(2):218-222.

COMPS, M.; TRINDADE, M.; DELSERT, C. 1996. Investigation of fish encephalitis virus (FEV) expression in marine fish using DIG-labeled probes. Aquaculture. **143**(2):113-121.

CVITANICH, J.D.; GARATE, 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**: 121-145.

DÍAZ, C. 1999. Comparación de las pruebas diagnósticas inmunofluorescencia indirecta y ensayo inmunoenzimático, para la detección de *Piscirickettsia salmonis*. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Medicina Veterinaria. 97 p.

FRYER, J.; LANNAN, C.; GARCÉS, L.; LARENAS, J.; SMITH, P. 1990. Isolation of a Rickettsiales-like Organism from Diseased Coho Salmon (*Oncorhynchus kisutch*) in Chile. Fish Pathol. **25**(2): 107-114.

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**: 120-126.

FRYER, J.L.; LANNAN, C.N. 1994. Rickettsial and chlamydial infections of freshwater and marine fishes, bivalves, and crustaceans. Zool. Stud. **33**:95-105.

FRYER, J.L.; MAUEL, M.J. 1997. The rickettsia: an emerging group of pathogens in fish. Emerging Infect. Dis. **3**(2):137-144.

FRYER, J.L.; HEDRICK, R.P. 2003. *Piscirickettsia salmonis*: a Gram-negative intracellular bacterial pathogen of fish. J Fish Dis. **26**: 251-262.

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. Org. **35**:107-113.

JAMETT, A.; AGUAYO, J.; MIQUEL, A.; MULLER, I.; ARRIAGADA, R.; BECKER, M.; VALENZUELA, P.; BURZIO, L. 2001. Characteristics of monoclonal antibodies against *Piscirickettsia salmonis*. J. Fish Dis. **24**: 205-215.

- JONES, S.; MARKHAM, R.J.F., GROMAN, D.; CUSACK, R.** 1998. Virulence and antigenic characteristics of a cultured Rickettsiales-like organism isolated from farmed Atlantic salmon *Salmo salar* in eastern Canada. *Dis. Aquat. Org.* **33**: 25-31.
- KUZYK, M.; THORTON, J.; KAY, W.** 1996. Antigenic Characterization of the Salmonid Pathogen *Piscireickettsia salmonis*. *Infec. Immun.* **64**: 5205-5210.
- KUZYK, M. A.; BURIAN, J.; THORNTON, J.C.; KAY, W.W.** 2001. OspA, a lipoprotein antigen of the obligate intracellular bacterial pathogen *Piscirickettsia salmonis*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **3**:83-93.
- LANNAN, C.N.; FRYER, J.** 1991. Recommended method for inspection of fish for the salmonid rickettsia. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* **11**:135-136.
- LANNAN, C.N.; FRYER, J.L.** 1994. Extracellular survival of *Piscirickettsia salmonis*. *J. Fish Dis.* **17**(5):545-548.
- LARENAS, J.; HIDALGO, L.; GARCÉS, H.; FRYER, J.; SMITH, P.** 1995. Piscirickettsiosis: lesiones en salmón del Atlántico (*Salmo salar*) infectados naturalmente con *Piscirickettsia salmonis*. *Av. Cienc. Vet.* **10**:53-58.
- LARENAS, J.; ASTORGA, C.; CONTRERAS, J.; SMITH, P.** 1996a. Detección de *Piscirickettsia salmonis* en ovas fertilizadas provenientes de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) experimentalmente infectados. *Arch. Med. Vet.* **28**:161-166.
- LARENAS, J.; ASTORGA, C.; CONTRERAS, J.; GARCÉS, H.; FRYER, J.L.; SMITH, P.** 1996b. Rapid detection of *Piscirickettsia salmonis* using microwave irradiation. *Fish Pathol.* **31**(4):231-232.
- LARENAS, J.; CONTRERAS, J.; OYANEDEL, S.; MORALES, M.A.; SMITH, P.** 1997. Efecto de la densidad poblacional y temperatura en truchas arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) inoculadas con *Piscirickettsia salmonis*. *Arch. Med. Vet.* **29**:113-119.
- LARENAS, J.; CONTRERAS, J.; SMITH, P.** 1998. Estado actual de la Piscirickettsiosis en Salmones. [en línea] *Aquatic Revista Electrónica de Acuicultura: Tecnología e Investigación en Castellano.* N° 5. <<http://aquatic.unisar.es/N1/art505/piscirick.htm>> [consulta: 12-03-2004]

LARENAS, J.; CONTRERAS, J.; SMITH, P. 2000. Piscirickettsiosis: uno de los principales problemas en cultivos de salmones en Chile. Tecnovet, Año 6, N° 2, 28-30.

LARENAS, J.; BARTHOLOMEW, J.; TRONCOSO, O.; FERNANDEZ, S.; LEDEZMA, H.; SANDOVAL, N.; VERA, P.; CONTRERAS, J.; SMITH, P. 2003. Experimental vertical transmisión of *Piscirickettsia salmonis* and *in vitro* study of attachment and mode of entrance into the fish ovum. Dis. Aquat. Org. **56**:25-30.

LOWRY, D.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, J. 1951. Protein measurement by the Folin's phenol reagent. J. Biol. Chem. **193**: 265-275.

MAUEL, M. J.; GIOVANNI, S.J.; FRYER, J.L. 1996 Development of polymerase chain reaction assays for detection, identification, and differentiation of *Piscirickettsia salmonis*. Dis. Aquat. Org. **26**:189-195.

MAUEL, M.; MILLER, M. 2002. Piscirickettsiosis and piscirickettsiosis-like infections in fish: a review. Vet. Microbiol. **87**:279-289.

NIELSEN, K.; GALL, D.; KELLY, W.; VIGLIOCCO, A.; HENNING, D.; GARCIA, M. 1996. Indirect Immunoassays. **In:** Immunoassays Development: Application to Enzyme Immunoassays for the Diagnosis of Brucellosis. Agriculture and Agri-Food. Ontario, Canada. pp 5.1- 7.7.

ÖZEL, M.; SCHWANZ-PFITZNER, I. 1975. Comparative studies by the electron microscope of rhabdoviruses of plants and of animal origin. III. Egtved virus (VHS) of the rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and rickettsia-like organisms (author's transl). Zentralbl Bakteriol [Orig]. 230(1)1-14.

QUIROZ, J Y CONSULTORES ASOCIADOS. 2005. Informe económico salmonicultura 2005. [en línea]. <http://www.salmonchile.cl/files/Informe%20Salmon%202005_DEF.pdf> [consulta: 13-10-2006].

(SAG) SERVICIO AGRÍCOLA Y GANADERO. 2007. [en línea]. <http://www.sag.gob.cl/pls/portal/docs/PAGE/PAGE_SAG_BIBLIOTECA/BIBL_INSYPROD/BIBLIO_INS_MED/BIBLIO_INS_MED_LISTAS/LISTAS_SALMONIDOS_REGISTRO_PROVISIONAL.PDF>. [consulta: 20-07-2007].

SCHÄFER, J.; ALVARADO, V.; ENRÍQUEZ, R.; MONRÁS, M. 1990. The coho salmon síndrome (CSS): A new disease in Chilean salmon, reared in sea water. Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol. 10:130.

- SILVA, P.** 2007. Comparación de la cinética de infección con *Piscirickettsia salmonis* entre ovas de salmón del Atlántico (*Salmo salar*) y trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*). Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. Fac. Medicina Veterinaria. 85p.
- SKARMETA, A.M.; HENRIQUEZ, V.; ZARH, M.; ORREGO, C.; MARSHALL, S.H.** 2000. Isolation of a virulent piscirickettsia salmones from the brain of naturally infected coho salmon. Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol. 20:261-263.
- SMITH, P.A.; LANNAN, C.N.; GARCÉS, L.H.; JARPA, M.; LARENAS, J.; CASWELL-RENO, P.; WHIPPLE, M.; FRYER, J.L.** 1995. Piscirickettsiosis: A bacterin field trial in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol. 15:137-141.
- SMITH, P.; CONTRERAS, J.; GARCÉS, H.; LARENAS, J.; OYANEDEL, S.; CASWELL-RENO, P.; FRYER, J.** 1996a. Experimental challenge of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with *Piscirickettsia salmonis*. J. Aquat. Anim. Health **8**:130-134.
- SMITH, P.A.; VECCHIOLA, I.M.; OYANEDEL, S.; GARCÉS, L.H.; LARENAS, J.; CONTRERAS, J.** 1996b. Antimicrobial sensitivity of tour isolates of *Piscirickettsia salmonis*. Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol. 16(5):164-168.
- SMITH, P.; CONTRERAS, J.; LARENAS, J.; AGUILLON, J.; GARCÉS, L.; PEREZ, B.; FRYER, J.** 1997. Immunization with Bacterial Antigens: Piscirickettsiosis. Fish Vaccinology. Dev. Biol. Stand. Basel, Karger **90**: 161-166.
- SMITH, P.; OJEDA, P.; PIZARRO, P.; CONTRERAS, J.; LARENAS, J.** 1998. Entry portal of *Piscirickettsia salmonis* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). In: Third International Symposium of Aquatic Animal Health. Baltimore, Maryland, USA.
- TIZARD, I.** 1998. Inmunología Veterinaria. 5ª ed. Interamericana. Mc Graw-Hill. pp 238-240.
- VOLLER, A.; BIDWELL, D.** 1986. Enzyme-linked immunosorbent assay. In: Manual of Clinical Laboratory Immunology. Srd. Ed., Eds. Rose, N.R., H. Friedman and G.L. Fahey. American Society for Microbiology, Washington, USA. pp 99-109.
- YUKSEL, S.A.; THOMPSON, K.; ELLIS, A.; ADAMS, A.** 2001. Purification of *P. salmonis* and associated phage particles. Dis. Aquat. Org. **44**: 231-235.