



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



CINETICA DE LA INFECCIÓN DE *Piscireckettsia salmonis* EN
OVAS DE TRUCHA ARCO IRIS (*Oncorhynchus mykiss*)

CARLOS PATRICIO GATICA ROSSÉ

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Patología Animal

PROFESOR GUÍA: Dr. JULIO LARENAS HERRERA

SANTIAGO, CHILE
2007



UNIVERSIDAD DE CHILE



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

CINETICA DE LA INFECCIÓN DE *Piscireckettsia salmonis* EN OVAS DE TRUCHA ARCO IRIS (*Oncorhynchus mykiss*)

CARLOS PATRICIO GATICA ROSSÉ

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Patología Animal

NOTA FINAL:

NOTA FIRMA

PROFESOR GUÍA : JULIO LARENAS HERRERA

PROFESOR CONSEJERO: PEDRO SMITH SCHUSTER

PROFESOR CONSEJERO: MARCO GALLEGUILLO CAAMAÑO

SANTIAGO, CHILE
2007

ÍNDICE

PAG.

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 Aspectos generales sobre piscirickettsiosis.....	3
2.2 Signos clínicos y lesiones.....	6
2.3 Diagnóstico.....	7
2.4 Mecanismos de transmisión.....	8
2.4.1 Transmisión horizontal.....	8
2.4.2 Transmisión vertical.....	9
3. OBJETIVOS.....	13
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
4.1 Peces.....	14
4.2 Ovas.....	15
4.3 Piscirickettsia salmonis.....	15
4.4 Metodología “dot-blot”.....	15
4.5 Determinación de la cinética en ovas	19
4.6 Esquema de infección experimental de ovas	21
4.7 Determinación de la concentración de proteínas	21
4.8 Análisis de resultados	21
5. RESULTADOS.....	23
6. DISCUSIÓN.....	33
7. CONCLUSIONES.....	37
8. BIBLIOGRAFIA.....	38

RESUMEN

En la presente Memoria de Título se utilizó el método "dot-blot" asociado a quimioluminiscencia para determinar la cinética de infección de dos cepas de *Piscirickettsia salmonis* en ovas de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*).

Debido a que no existía información bibliográfica acerca de la utilización del método "dot blot" para detectar la infección de las ovas con *P. salmonis*, fue necesario estandarizar la técnica, por lo cual se realizaron distintos experimentos para ver la especificidad de los anticuerpos, la sensibilidad del método, el efecto de la desnaturalización de las muestras y la dilución más adecuada de los anticuerpos.

Se realizó el experimento de cinética en ovas de trucha arco iris (*O. mykiss*) utilizando los tiempos de 1, 3, 5, 10, 30 y 60 minutos. Las ovas se depositaron individualmente en tubos Eppendorf, a los cuales se les agregó 400 micro L de inóculo bacteriano (sobrenadante de cultivo celular con aproximadamente 100% de efecto citopático). Se utilizaron 2 grupos de ovas por cada tiempo, uno de ellos se cultivó con la cepa LF-89 y el otro con la cepa SLGO-95. La reacción fue detenida mediante la eliminación del inóculo y dos lavados con solución "buffer" PBS pH 7,2. Posteriormente las ovas fueron congeladas a -70 grados C hasta su procesamiento. Se utilizaron además dos grupos controles (5 y 60 min), que corresponden a ovas que se incubaron con 500 micro L de MEM. Las ovas fueron homogeneizadas para realizar la metodología "dot-blot". Las películas obtenidas fueron escaneadas y evaluadas mediante densitometría por un "software" computacional.

Los resultados indican reacción positiva a partir del primer tiempo estudiado para ambas cepas, la que se mantiene hasta el último tiempo estudiado. El análisis densitométrico señala que la reacción aumenta a medida que transcurre el tiempo, entregando una señal proporcionalmente más alta para SLGO-95 que para LF-89, lo que es concordante con estudios de virulencia en peces que señalan que esta cepa produce mortalidades más altas y más tempranas. Además los resultados apoyan la vía vertical de transmisión.

1. INTRODUCCIÓN

La piscirickettsiosis es una enfermedad septicémica, que se presenta en países del hemisferio norte y Chile, en centros de cultivos de salmónidos, especialmente, durante la fase de desarrollo en agua de mar. En nuestro país, ha provocado cuantiosas pérdidas económicas debido a las altas tasas de mortalidad y costo de tratamiento.

El agente etiológico de la enfermedad es una bacteria denominada *Piscirickettsia salmonis*, la cual fue aislada por primera vez en el sur de Chile en 1989. La cepa de referencia se denomina LF-89, sin embargo, hasta la fecha han sido aisladas y caracterizadas otras variantes, entre ellas, la SLGO-95, que ha demostrado tener una alta virulencia y resistencia a algunos antimicrobianos.

Las vías de transmisión de la enfermedad aún no están claramente definidas. Se ha descrito, experimentalmente, que la bacteria puede penetrar por piel y branquias intactas, aunque el mecanismo preciso de entrada por estas vías no es conocido. Con relación a la transmisión vertical, se ha demostrado que el agente se puede transmitir desde reproductores, machos y/o hembras experimentalmente infectados, hacia su progenie. Es así como el agente se ha detectado en ovas al “estado de ojo”, alevines de saco y peces de 1 g. Recientemente, se ha descrito la transmisión vertical en salmón coho en condiciones de cultivo.

En un estudio reciente, se comprobó mediante microscopía de barrido, que la cepa LF-89 se adhiere a la pared de la ova mediante prolongaciones de su membrana externa, estructuras que han sido denominadas "Complejo de Adhesión Piscirickettsial" o CAP, lo que facilitaría la posterior penetración de la bacteria al interior de la ova.

A pesar de que existen publicaciones que demuestran diferencias en virulencia y sensibilidad frente a quimioterápicos, no se conoce si la infección de la ova *in vitro* es similar para diferentes cepas bacterianas de *P. salmonis*. Por lo anterior, la presente memoria consistió en establecer, mediante la técnica de “dot blot”, la cinética de infección de la bacteria a ovas de trucha arco iris, comparando las cepas LF-89 y SLGO-95. Cabe destacar que es la primera vez que se utiliza esta metodología para detectar la infección con *P. salmonis*.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Aspectos generales sobre piscirickettsiosis

El “síndrome de Huito”, “síndrome del salmón coho” (Bravo y Campos, 1989), “septicemia rickettsial salmonídea” (SRS) (Cvitanich *et al.*, 1991) o piscirickettsiosis como se conoce actualmente (Fryer *et al.*, 1992), es la principal enfermedad de tipo sistémica que afecta el cultivo de peces salmónidos en Chile.

Fryer *et al.* (1990), a partir de tejido renal de un salmón coho moribundo lograron aislar y caracterizar el agente causal, usando para ello un cultivo celular de la línea de embrión de salmón chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*), CHSE-214 (ATCC CRL 1681) (Lannan *et al.*, 1984). El tejido renal fue removido asépticamente e inoculado directamente en frascos de cultivo que contenían una monocapa celular mantenida en Medio Esencial Mínimo de Eagle con sales de Earle (MEM), libre de antibióticos y suplementado con 10% de suero fetal bovino (MEM-10).

Posteriormente, en 1992, Fryer *et al.*, de acuerdo con el análisis de la subunidad 16S del ARN ribosomal, clasificaron esta bacteria como *Piscirickettsia salmonis* gen. nov. sp. nov., perteneciente al orden Rickettsiales y la familia Rickettsiaceae. Recientemente, la bacteria ha sido reclasificada dentro de la clase de las Gammaproteobacterias, perteneciendo al orden Thiotrichales y formando una nueva familia llamada Piscirickettsiaceae (Garrity y Holt, 2001).

Piscirickettsia salmonis corresponde a un microorganismo intracelular obligado, gramnegativo, inmóvil, acapsulado, pleomórfico, predominantemente cocoide, en pares o en forma de anillo y de un tamaño variable entre 0,5-1,5 µm de diámetro. Se multiplica por división binaria dentro de vacuolas citoplasmáticas rodeadas por una membrana, en forma esparcida o en agrupaciones que le dan el

aspecto de mórula. Es citopática para cuatro líneas celulares de salmónidos (CHSE-214, CSE-119, CHH-1 y RTG-2) y dos de peces de aguas cálidas (EPC y FHM), produciendo inicialmente la formación de agrupaciones de células redondeadas y vacuolizadas y finalmente la lisis con desprendimiento de la monocapa. Su temperatura óptima de crecimiento *in vitro* se encuentra dentro del intervalo de 15 a 18°C, disminuyendo su replicación bajo 10°C y sobre 21°C. Para su conservación a -70°C se recomienda el uso del criopreservante DMSO. Mediante el uso de microscopía electrónica de transmisión se ha observado que el agente posee en su superficie dos membranas, una externa ondulada y una interna citoplasmática (Fryer *et al.*, 1990; Cvitanich *et al.*, 1991).

La cepa LF-89 es la de referencia, se encuentra depositada en la American Type Culture Collection (ATCC), registrada como VR-1361 y corresponde al primer aislado de *P. salmonis* descrito. Es sensible a un amplio rango de antibióticos, excepto a penicilina G (Fryer *et al.*, 1990; Cvitanich *et al.*, 1991).

Posteriormente, han sido aisladas cepas más resistentes a los antibióticos y más virulentas, tales como las cepas SLGO-94, aislada desde trucha arco iris en 1994, y la SLGO-95, aislada desde salmón coho en 1995 de centros de cultivo marino del sur de nuestro país (Smith *et al.*, 1996).

Los brotes de la enfermedad se presentan generalmente entre abril y agosto (otoño y mediados de invierno), 6 a 12 semanas después de que los “smolts” son transferidos a la fase marina del ciclo productivo, pudiendo durar hasta 10 semanas y luego declinar (Cvitanich *et al.*, 1991).

La piscirickettsiosis se presenta durante la fase marina del cultivo de especies de salmónidos, sin embargo, eventualmente se han descrito brotes de la enfermedad en agua dulce en la Décima Región de Chile. Uno de ellos se presentó en el Lago Llanquihue, en un grupo de truchas arco iris (*O. mykiss*) provenientes de ovas

importadas desde los Estados Unidos, las que siempre fueron mantenidas en agua dulce. Aunque la bacteria no fue aislada en este caso, los peces mostraron las mismas lesiones macroscópicas externas e internas que presentan los salmónidos severamente infectados con *P. salmonis* en agua salada (Bravo, 1994). En otro caso, Gaggero *et al.* (1995) informaron del primer aislamiento de *P. salmonis* desde peces enfermos durante la fase de agua dulce de su ciclo de vida. Los peces afectados fueron obtenidos desde varias instalaciones de agua dulce localizadas en la isla de Chiloé. Las lesiones observadas fueron concordantes con las descritas previamente en los brotes en ambiente marino y las características de crecimiento *in vitro* del aislado correspondieron a las de *P. salmonis*. El origen de la infección en estos casos no fue establecido.

La enfermedad afecta a un amplio rango de especies de salmónidos. Sin embargo, recientemente se ha reportado el aislamiento de un microorganismo “*Piscirickettsia salmonis-like*” que produjo mortalidad en “white seabass” (*Atractoscion nobilis*) en el sur de California, Estados Unidos. En los peces se presentaron, además, signos y lesiones similares a las producidas por *P. salmonis*. La bacteria reaccionó positivamente a los anticuerpos anti- *P. salmonis* en la prueba de inmunofluorescencia. Además, fue cultivada en la línea celular CHSE-214 donde produjo efecto citopático. Al inocularse una dosis intraperitoneal en peces juveniles de salmón coho produjo un 80% de mortalidad dentro de los 10 días post inoculación (Chen *et al.*, 2000).

Smith *et al.* (1996) demostraron la existencia de gran variabilidad en los patrones de sensibilidad antimicrobiana de cuatro aislados diferentes de esta bacteria (LF-89, EM-90, SLGO-94 y SLGO-95). Este estudio además, comprobó que existe una diferencia en la virulencia de las diferentes cepas actuantes.

Larenas *et al.* (1997) estudiaron el efecto concomitante de la densidad poblacional y la temperatura del agua en la presentación de la enfermedad. Los

resultados mostraron una mayor mortalidad acumulada (24%) en el grupo de mayor densidad poblacional (20 kg/m³) asociado a una temperatura de 14°C.

Por otra parte, Pizarro (1998) evaluó experimentalmente las condiciones de estrés con la presentación de la enfermedad en trucha arco iris, demostrando un papel importante de este factor.

En un estudio para conocer las vías de excreción de *P. salmonis*, Salinas *et al.* (1997) demostraron la presencia del microorganismo en heces, orina y bilis de peces experimentalmente infectados. Esta eliminación aumentó en los peces que se encontraron moribundos. Estos resultados asociados al hecho de que el agente tiene una alta supervivencia en agua salada (Lannan y Fryer, 1994) y que el agente puede ingresar por piel y branquias aparentemente intactas (Smith *et al.*, 1999), hacen aconsejable la pronta extracción de los peces enfermos y muertos de las balsas-jaula.

2.2 Signos clínicos y lesiones

Una gran cantidad de signos y síntomas clínicos se asocian con esta infección bacteriana, pero pocos de ellos son específicos de la piscirickettsiosis. Generalmente los peces enfermos se ubican en la cercanía de la superficie del agua, preferentemente en las orillas de las balsas-jaulas (Bravo y Campos, 1989), tienen un nado lento, errático, descoordinado y a veces en tirabuzón (Larenas *et al.*, 1995). Presentan coloración corporal oscura y acentuada palidez branquial, lo que refleja una anemia severa, corroborada por los niveles de hematocrito que en peces moribundos corresponde a un 27% o menos (Bravo y Campos, 1989). Los peces moribundos presentan lesiones de piel como erosiones cutáneas y extensas áreas descamadas (Larenas *et al.*, 1995).

A la necropsia, el hígado se observa aumentado de tamaño y con presencia de nódulos subcapsulares de color cremoso a amarillento. El bazo está aumentado de tamaño. El tubo digestivo se encuentra sin contenido y presenta petequias, el estómago contiene un líquido transparente seromucoso, lo que da la impresión de que el pez ha “tragado agua”. El riñón se observa de mayor tamaño. El corazón, en algunos casos, está cubierto con una pseudomembrana blanquecina, lo que sugiere pericarditis. También existe un aumento en el volumen del líquido cefalorraquídeo, acompañado en muchos casos de una congestión de las membranas meníngeas, lo que es congruente con los signos nerviosos (Bravo y Campos, 1989; Cvitanich *et al.*, 1991; Larenas *et al.*, 1995).

Al examen histopatológico se observa inflamación leve, células necróticas y cambios degenerativos en todos los órganos anteriormente nombrados y un gran número de microorganismos difusamente teñidos. En los vasos se observa coagulación intravascular diseminada y trombos de fibrina (Bravo y Campos, 1989; Cvitanich *et al.*, 1991; Larenas *et al.*, 1995).

2.3 Diagnóstico

Inicialmente *P. salmonis* se detectó en frotis y tejidos teñidos con Giemsa, Hematoxilina-Eosina (HE), Gram, naranja de acridina y azul de toluidina (Fryer *et al.*, 1990; Cvitanich *et al.*, 1991), que son tinciones rápidas, pero no específicas.

La técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) desarrollada por Lannan *et al.* (1991b), es la más utilizada. Sin embargo, los tiempos de incubación de los anticuerpos son elevados, por lo cual la técnica ha sido modificada mediante el uso de microondas (Larenas *et al.*, 1996a), disminuyendo marcadamente los tiempos de incubación de los anticuerpos, sin afectar la sensibilidad y especificidad de la prueba.

El método de diagnóstico más concluyente es el aislamiento, el cual se realiza mediante la inoculación de tejido renal, proveniente de peces infectados, en cultivos celulares; sin embargo, no se recomienda como un método diagnóstico rutinario, ya que es de fácil contaminación debido a que el cultivo debe estar libre de antibióticos (Lannan y Fryer, 1991a).

Actualmente, se han implementado otras técnicas, como el ensayo inmunoenzimático (ELISA) para la cuantificación de *P. salmonis* (Aguayo *et al.*, 2002) y la prueba de reacción de polimerasa en cadena (PCR) para la detección, identificación y diferenciación de cepas de esta bacteria (Mauel *et al.*, 1996).

2.4 Mecanismos de transmisión

2.4.1 Transmisión horizontal

Cvitanich *et al.* (1991) demostraron la transmisión de *P. salmonis* en salmón coho mantenido tanto en agua dulce como salada, sin la presencia de vectores parásitos. La infección se produce a pesar de que se ha demostrado una baja viabilidad *in vitro* de *P. salmonis* en agua dulce; sin embargo, puede sobrevivir en agua salada por un período de hasta tres semanas (Lannan y Fryer, 1994). Se ha postulado que una o más especies nativas de animales acuáticos, o que algunos artrópodos marinos puedan actuar como potenciales vectores o reservorios de *P. salmonis* (Fryer *et al.*, 1990; Cvitanich *et al.*, 1991).

Almendras *et al.* (1997), compararon rutas de infección con *P. salmonis* en forma intraperitoneal (IP), oral y branquias en salmón del Atlántico (*Salmo salar*) y también evaluaron la importancia del contacto físico en la transmisión horizontal de la enfermedad. El agente patógeno fue transmitido horizontalmente en peces con y sin

contacto físico, siendo significativamente más rápida en el primer grupo. Las vías IP y branquias presentaron mortalidades significativamente más altas que los peces desafiados por vía oral. Además se observó *P. salmonis* en túbulos renales lo que sugiere para estos autores que el agente puede ser eliminado vía urinaria.

Experimentalmente, Salinas *et al.* (1997), observaron la presencia de *P. salmonis* en heces, orina y bilis luego de inocular IP truchas arco iris con el aislado SLGO-95. Además, determinó el efecto de dos densidades poblacionales (20 kg/m³ y 40 kg/m³) en la presentación y en la transmisión horizontal de piscirickettsiosis en condiciones de agua dulce. Los resultados obtenidos demostraron que *P. salmonis* puede ser transmitida horizontalmente a peces sanos que cohabitan con peces inoculados en ausencia de vectores, existiendo un sinergismo con la densidad poblacional.

Smith *et al.* (1999), investigaron diferentes rutas de ingreso de *P. salmonis* por medio del uso de varios métodos de desafío en truchas arco iris juveniles. Los resultados demuestran que los sitios de entrada más probables del agente serían piel y branquias intactas. La alta mortalidad de peces inyectados en forma subcutánea sugiere que los ectoparásitos pueden jugar un rol importante en la transmisión natural de la enfermedad.

2.4.2 Transmisión vertical

Inicialmente, Cvitanich *et al.* (1991), demostraron la presencia del agente en ovarios, fluido celómico y testículos de salmones infectados naturalmente con *P. salmonis*. Sin embargo, en el trabajo publicado no se detalla el tipo de alteración, la ubicación precisa del agente, ni el tipo de células infectadas.

Los reportes de piscirickettsiosis en agua dulce sugieren para algunos autores la posible existencia de una vía vertical de transmisión, ya que la factibilidad de transmisión horizontal sería muy improbable bajo estas condiciones (Bravo, 1994; Gaggero *et al.*, 1995).

Los estudios de Rivera (1998) indican la ubicación de *P. salmonis* en estroma y vitelo de ovarios de peces naturalmente infectados, sin embargo, los resultados no fueron concluyentes, ya que el método utilizado fue inmunofluorescencia indirecta, que no es un buen método de tinción para histopatología, para establecer así la ubicación exacta del patógeno.

En el mismo sentido, Rojas (2003) demostró en reproductores infectados experimentalmente con *P. salmonis*, la infección del tejido ovárico. El agente fue observado en el tejido conectivo (estroma), células de la teca externa, epitelio folicular y en el interior de vacuolas citoplasmáticas de ovocitos en distintos estados de desarrollo. En el estudio secuencial de la infección, mediante microscopía óptica, se observó la bacteria desde el día 7 post infección (p.i.) y en todos los tiempos hasta el día 20 p.i., lo que podría indicar que las ovas se infectan desde un estado temprano de desarrollo en el tejido ovárico, pudiendo generar gametos viables portadores de la bacteria.

En forma experimental, Larenas *et al.* (1996b), detectaron alrededor de un 10% de infectividad de ovas fértiles, provenientes de reproductores de trucha arco iris, machos y/o hembras, inoculados IP con el agente. Además, el microorganismo fue encontrado en escasa a moderada cantidad dentro de la ova y fluido celómico, así como también en el fluido seminal. Todos los grupos de ovas fertilizadas provenientes de machos y/o hembras inoculadas, demostraron presencia del agente, aunque no se determinó posteriormente si estas ovas infectadas podían dar origen a alevines viables. Sin embargo, las ovas muestreadas estaban en “estado de ojo”, por lo que se podría suponer una persistencia de la infección en una etapa posterior.

Larenas *et al.* (2003), demostraron que todos los grupos de ovas fertilizadas provenientes de machos y/o hembras reproductoras inoculadas IP con *P. salmonis*, fueron capaces de generar alevines de saco infectados viables, así como también, alevines de 1 g de peso. Además, estos investigadores lograron obtener alevines infectados colocando una suspensión bacteriana durante el proceso de fertilización, señalando que el patógeno ingresa a la ova durante esta etapa.

Recientemente, se ha descrito la transmisión vertical en salmones de cultivo. Los alevines infectados no presentaron signos o síntomas de la enfermedad, sin embargo, son capaces de excretar el agente por vía fecal (Larenas *et al.*, 2005),

Mediante microscopía electrónica de barrido, se observó que *P. salmonis* emite prolongaciones que le permiten adherirse a la pared de la ova, llamadas Complejo de Adhesión Piscirickettsial (CAP). Además, en el mismo estudio, se observó que el microorganismo era capaz de ingresar al interior de la ova a partir de los 5 min de contacto (Larenas *et al.*, 2003).

Los experimentos anteriormente nombrados han sido realizados con la cepa LF-89, sin embargo, existen otras cepas, entre ellas la SLGO-95, que ha demostrado ser más resistente a las terapias antimicrobianas y más virulenta. Smith *et al.* (1996), demostraron la existencia de una gran variabilidad en los patrones de sensibilidad antimicrobiana de cuatro aislados diferentes de *P. salmonis*. Ante el desafío de las cepas a una serie de antibióticos, LF-89 fue sensible a la mayoría de ellos, mientras SLGO-95, sólo fue sensible a gentamicina.

En una investigación para comparar la virulencia de distintas cepas de *P. salmonis*, Smith *et al.* (1997), inocularon peces IP con tres aislados diferentes (LF-89, SLGO-94 y SLGO-95). Los inoculados con SLGO-95 tuvieron mortalidades

acumuladas más altas y mas tempranas que los inoculados con LF-89, lo que indica que la primera cepa es más virulenta.

El presente estudio pretende aportar conocimientos sobre la cinética de la infección de *P. salmonis* en la ova, comparando dos cepas diferentes, LF-89 y SLGO-95, mediante el método de detección “dot blot” asociado a quimioluminiscencia, técnica que no ha sido hasta la fecha utilizada para el diagnóstico de la infección de la bacteria.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

- Caracterizar la cinética de la infección de ovas de peces salmonídeos con dos cepas de *Piscirickettsia salmonis* de distinta virulencia.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Establecer y aplicar la técnica de “dot blot” para determinar la infección de ovas de trucha arco iris con *Piscirickettsia salmonis*.
- Determinar y comparar la cinética de la infección de ovas de trucha arco iris con las cepas LF-89 y SLGO-95 de *P. salmonis*.

4. MATERIAL Y MÉTODO

La presente memoria se realizó en las unidades de Anatomía Patológica y Patología de Organismos Acuáticos del Departamento de Patología Animal y, en el Laboratorio de Bioquímica y Química del Departamento de Ciencias Biológicas Animales de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

4.1 Peces

Se utilizaron 30 reproductores de trucha arco iris (*O. mykiss*) de 800 g de peso, provenientes de una piscicultura de la Quinta Región, donde no se han reportado casos de piscirickettsiosis. Una vez llegados al laboratorio fueron sometidos a un periodo de cuarentena y tratados preventivamente contra hongos y parásitos externos. Los peces fueron mantenidos en la Unidad Experimental del Departamento de Patología Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile en un estanque plástico de 2500 L de capacidad, al cual se le suministró agua potable permanente filtrada y clorada por un filtro automático de carbón activado (Aguasin® modelo CA-30, Chile). El agua de salida fue clorada (5 ppm) y tratada mediante luz UV. El estanque tenía suministro de aire continuo mediante un sistema de bombas independientes. Los peces fueron alimentados dos veces al día con una dieta de mantención al 1% del peso vivo, mediante un alimento en “pellet” de origen comercial. Un grupo de 10 peces fue eutanasiado para establecer el estado sanitario de los reproductores, realizándose necropsia y toma de muestras de frotis renal para evaluarlos mediante la técnica de inmunofluorescencia para la detección de *Renibacterium salmoninarum* y para *Piscirickettsia salmonis*, esto último mediante la técnica establecida por Lannan *et al.* (1991b), modificada por Larenas *et al.* (1996a).

4.2 Ovas

Las ovas fueron obtenidas mediante frezado manual durante el periodo de desove (abril – mayo) y posteriormente depositadas en un recipiente estéril evaluándose su calidad, mediante inspección externa, no debiendo presentar señales de sobremaduración, de acuerdo a lo establecido por Blanco (1995).

4.3 *Piscirickettsia salmonis*

Se utilizaron las cepas LF-89 y SLGO-95, las cuales estaban preservadas en nitrógeno líquido. La bacteria fue multiplicada en la línea celular CHSE-214 en medio esencial mínimo de Eagle con sales de Earle (MEM), libre de antibióticos y suplementada con 10% de suero fetal bovino (MEM-10) incubada a 18°C, de acuerdo a la metodología establecida por Fryer *et al.* (1990). El microorganismo fue utilizado una vez que se observó un efecto citopático cercano al 100%. El sobrenadante fue titulado mediante la dilución punto final en placa (Reed y Muench, 1938) utilizándose un título aproximado de 10^5 TCID₅₀/mL.

4.4 Metodología “dot blot”

Para realizar el procedimiento “dot blot” se utilizó un aparato BioDot (Bio-Dot® Apparatus, BioRad) conectado a una bomba de vacío. Las proteínas fueron retenidas en una membrana de polivinildifluoruro (PVDF) (Inmun-Blot® PVDF Membrane for Protein Blotting 0,2 µm, BioRad). La metodología empleada consistió principalmente en los siguientes pasos:

- Activación de la membrana PVDF, con metanol por 20 s, posteriormente se lava con agua destilada por 1 min y con “buffer” PBS por 2 min.

- Carga de las muestras
- Bloqueo con una solución de TBS 1X Tween 20 con leche descremada al 6% en refrigeración por 24 h.
- Incubación por 2 h con anticuerpo oligoclonal, el cual corresponde a una mezcla de seis anticuerpos monoclonales (Inmunoglobulina G de ratón anti-*P. salmonis*, Kit SRS Fluorotest Indirecto, BiosChile).
- Incubación con un segundo anticuerpo, anti Ig G de ratón elaborado en cabra y conjugado con peroxidasa (ImmunoPure® Antibody Horseradish Peroxidase, Pierce) por 1 h en dilución 1:15.000.
- Reacción enzimática con el sustrato (Super Signal®, Chemiluminiscent Horseradish Peroxidase, Pierce).
- Exposición a una película autorradiográfica (Kodak BioMax MR-1 Film 8 x 10 in, Sigma) dentro de un “cassette” de exposición (Exposure cassette, vinyl-covered with Velcro® closure For 8 x 10 in film, Sigma-Aldrich) por 10 a 30 min.
- Revelado de la película.
- Evaluación mediante densitometría por un “software” computacional (Un-Scan-It Versión 4.1, 1996).

4.4.1 Estandarización de la técnica “dot blot”

Debido a que no existía información bibliográfica acerca de la utilización del método “dot blot” para detectar la infección de las ovas con *P. salmonis*, fue necesario establecer los siguientes puntos para estandarizar la técnica:

4.4.1.1 Especificidad del anticuerpo anti- *P. salmonis*

Se probó la especificidad del método “dot blot” utilizando, como control positivo un sobrenadante de cultivo bacteriano de la cepa LF-89 que presentaba un efecto citopático cercano al 100%. La bacteria se encontraba en su pasaje número 28 y era mantenida en un incubador a 18°C. Como controles negativos se contó con un cultivo celular CHSE-214, sin infectar, con MEM-10 y otra muestra de células lavadas

y centrifugadas, además se realizaron controles de un homogeneizado de ova, MEM y MEM-10.

4.4.1.2 Especificidad del segundo anticuerpo

Para verificar la especificidad del segundo anticuerpo se procedió a evaluar dos membranas en paralelo, una de las cuales fue incubada sólo con el segundo anticuerpo. Como control positivo se utilizó un sobrenadante de cultivo bacteriano de la cepa LF-89 que presentaba un efecto citopático cercano al 100%. La bacteria se encontraba en su pasaje número 28 y era mantenida en estufa a 18°C. Una fracción de la muestra fue lavada mediante dos centrifugaciones eliminando restos celulares y MEM-10. Como control negativo se contó con un homogeneizado de ova.

En ambas membranas se cargaron 30 µL de cada muestra. Las membranas se bloquearon con TBS 1X Tween 20 con leche descremada al 6% manteniéndose a 4°C. Después de 24 h, una de las membranas se retiró de la refrigeración y se incubó con el primer anticuerpo. Posteriormente ambas membranas se incubaron con el segundo anticuerpo.

4.4.1.3 Sensibilidad del método

Se realizaron ensayos con diluciones seriadas del cultivo bacteriano, para lo cual se utilizó PBS como diluyente. Para evaluar la sensibilidad del método se procedió a diluir la muestra de cepa LF-89 con solución "buffer" PBS pH 7,4, obteniendo diluciones desde 56 hasta 0,02 µg de proteína total.

Posteriormente se realizaron diluciones mayores (10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3}) desde la muestra inicial con 2,8 µg/µL de proteína. En cada pocillo se cargaron 10 µL de muestra sin diluir (28 µg proteína total), 10 µL de dilución 10^{-1} (2,8 µg proteína total), 10 µL de dilución 10^{-2} (0,28 µg proteína total) y 10 µL de dilución 10^{-3} (0,028 µg de

proteína total). Se incubó la membrana por 2 h con el primer anticuerpo diluido 1:6.500 y 1 h con el segundo anticuerpo diluido 1:15.000.

Para mejorar la detección se procedió a centrifugar las muestras a 11.000 x g por 60 min y luego se resuspendió el “pellet” en 150 μ L de PBS pH 7,4.

4.4.1.4 Efecto de la desnaturalización

Ante el desafío de no conocer contra qué antígenos estaba dirigida la mezcla de anticuerpos monoclonales anti-*P. salmonis*, se procedió a desnaturalizar la muestra para ver si existían diferencias de sensibilidad entre la muestra tal cual o nativa y la muestra desnaturalizada. Para esto se recurrió a hervir las muestras a 100°C durante 10 min.

En los pocillos se cargaron 10 μ L de muestra de sobrenadante de cultivo celular infectado con *P. salmonis* sin hervir (28 μ g de proteína total), 10 μ L de homogeneizado de ova sin hervir (20 μ g de proteína total), 10 μ L de *P. salmonis* hervida y 10 μ L de homogeneizado de ova hervido. La membrana se incubó con el primer anticuerpo diluido 1:6.500 por 2 h y el segundo anticuerpo diluido 1:15.000 por 1 h.

4.4.1.5 Dilución más adecuada del primer anticuerpo

Se cargaron tres membranas con muestras de control positivo de *P. salmonis*. En cada membrana se cargaron 5 y 10 μ L de muestra (14 y 28 μ g total de proteína) y la misma cantidad de la muestra bacteriana diluída 10^{-1} (1,4 y 2,8 μ g de proteína total). Posteriormente las membranas fueron incubadas en recipientes individuales con el primer anticuerpo en diluciones 1:1.000, 1:5.000 y 1:10.000 respectivamente.

4.5 Determinación de la cinética de la infección en ovas

4.5.1 Cepa LF-89

Las ovas se dividieron en 6 grupos (2 ovas por cada grupo): 1, 3, 5, 10, 30 y 60 min. Se colocaron en tubos Eppendorf de 1,5 mL, a los cuales se les agregó 500 μ L de sobrenadante de un cultivo celular con efecto citopático cercano al 100% que se encontraba en su pasaje número 29, el cual fue filtrado. Transcurridos los tiempos de incubación se eliminó el cultivo bacteriano y se realizaron dos lavados con PBS pH 7,4. Posteriormente las ovas fueron congeladas a -70°C hasta su procesamiento. Se utilizaron además dos grupos controles (5 y 60 min), que corresponden a ovas que se incubaron con 500 μ L de MEM.

Cada ova, individualmente, fue depositada en un tubo de centrifugación de 5 mL. Se le agregó 1 mL de “buffer” de homogeneización, el cual consiste en una mezcla de “buffer” Tris pH 7,4 con inhibidores de proteasas. Fue procesado en un homogeneizador durante 45 seg. El homogeneizado resultante fue centrifugado a 1.000 x g durante 20 min para eliminar los restos celulares groseros. Se recuperó el sobrenadante y se centrifugó a 11.000 x g durante 60 min. Finalmente, se eliminó el sobrenadante y el “pellet” fue resuspendido en 150 μ L de PBS. Este resuspendido final es el que posteriormente fue analizado en el “dot blot” (Fig. 1).

Como control de viabilidad de la bacteria, una parte del sobrenadante, utilizado para infectar las ovas, fue inoculado y titulado en la línea CHSE-214.

4.5.2 Cepa SLGO-95

Las ovas se dividieron en 6 grupos (2 ovas por cada grupo): 1, 3, 5, 10, 30 y 60 min. Se colocaron en tubos Eppendorf de 1,5 mL, a los cuales se les agregó 500 μ L de sobrenadante de un cultivo celular con efecto citopático cercano al 100% que se encontraba en su pasaje número 10, el cual fue filtrado. Transcurridos los tiempos

de incubación se eliminó el cultivo bacteriano y se realizaron dos lavados con PBS pH 7,4. Posteriormente las ovas fueron congeladas a -70°C hasta su procesamiento. Se utilizaron además dos grupos controles (5 y 60 min), que corresponden a ovas que se incubaron con $500\ \mu\text{L}$ de MEM.

Cada ova, individualmente, fue homogeneizada de la misma forma que se explicó en el punto 4.5.1. (Fig. 1).

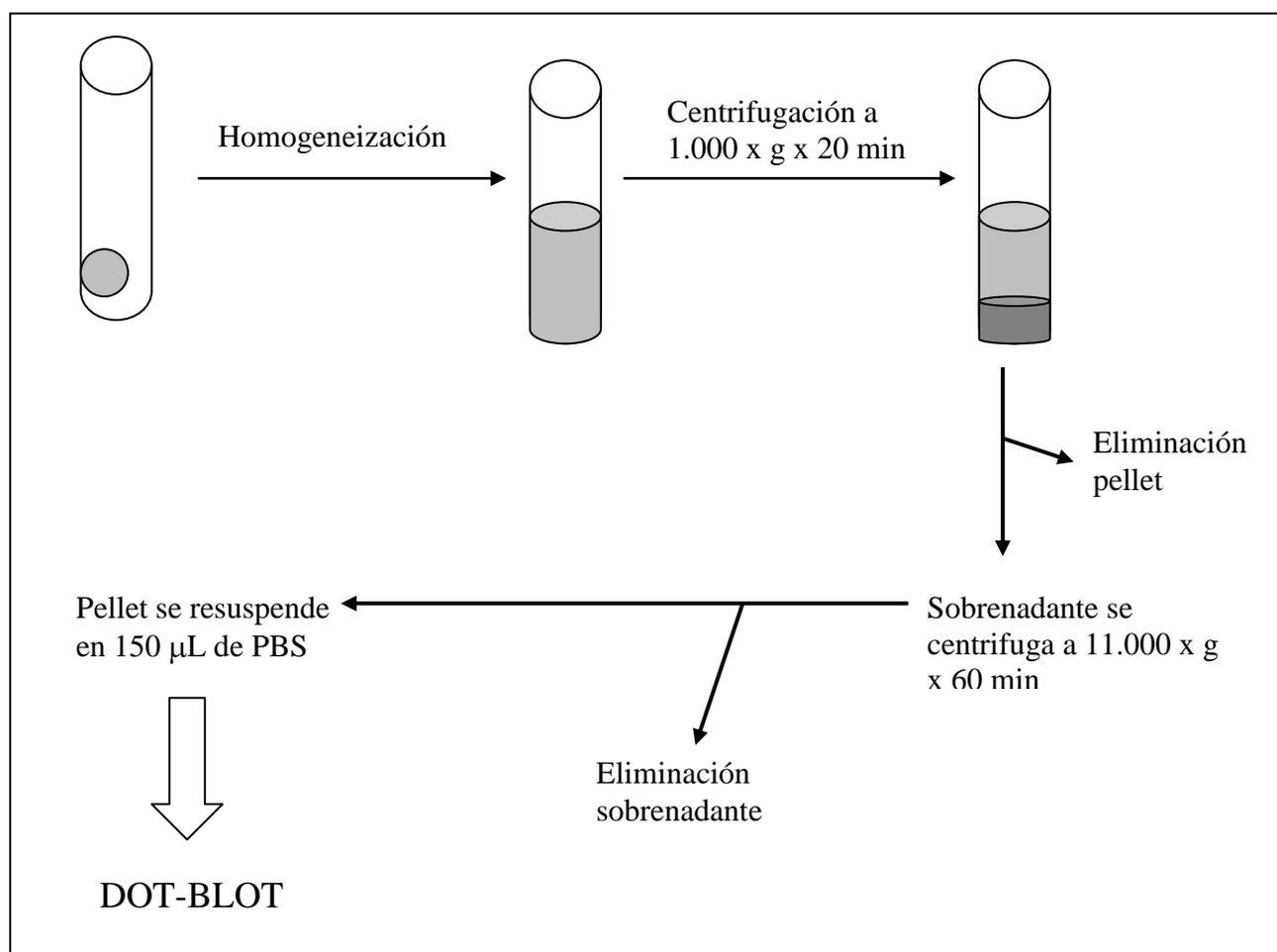


Figura 1: Esquema de procesamiento de las ovas para ser evaluadas en el dot-blot.

4.6 Esquema de infección experimental de las ovas

La tabla 1, muestra los diferentes esquemas de desafíos a los cuales fueron sometidos las ovas.

Tabla 1. Esquema de desafío de ovas de trucha arco iris inoculadas con dos cepas de *Piscirickettsia salmonis* en diferentes tiempos de exposición.

Muestra	Tiempo (min)					
	1	3	5	10	30	60
Ovas + LF-89	●	●	●	●	●	●
Ovas + SLGO-95	●	●	●	●	●	●
Ovas + MEM (control negativo)			●			●

4.7 Determinación de la concentración de proteínas.

Se determinó la concentración de proteínas totales de cada muestra por el método espectrofotométrico de Lowry, utilizando como estándar albúmina sérica bovina (Lowry *et al.*, 1951).

4.8 Análisis de resultados

En cada membrana se cargó una muestra de sobrenadante de cultivo celular de *P. salmonis*, cuyos píxeles totales, medidos por densitometría, correspondieron como referencia al 100% de carga bacteriana inicial. Posteriormente, el número de píxeles del resto de las muestras se expresó como porcentaje de infección de la ova con respecto a la dosis inicial.

Se realizó un análisis descriptivo con relación al tiempo y porcentaje de infección de la ova. Para comparar los resultados entre las dos cepas se realizó un análisis estadístico por medio de la prueba de t-student para dos variables.

5. RESULTADOS

5.1. Peces

Los peces eutanasiados y analizados para el control de salud no evidenciaron lesiones anátomo-patológicas a la necropsia. Las pruebas de inmunofluorescencia entregaron resultados negativos a la presencia de *Renibacterium salmoninarum* y *Piscirickettsia salmonis*.

5.2 Ovas

A la inspección visual las ovas no presentaban señales de sobremaduración, encontrándose en buenas condiciones para el experimento.

5.3 Estandarización del método “dot blot” para la detección de la infección con *Piscirickettsia salmonis*.

5.3.1 Especificidad del anticuerpo anti- *P. salmonis*

Los resultados indicaron que existía reactividad cruzada con el cultivo celular con MEM-10 y con el MEM-10 al cargar 70 µg totales de proteína. Sin embargo, no hubo reacción con el cultivo celular sometido a lavado con PBS, con el MEM sin suero fetal bovino ni con el homogeneizado de ova (Fig. 2).

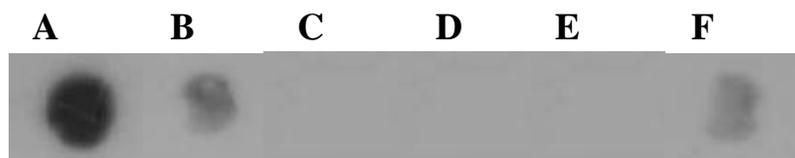


Figura 2. “Dot blot”. Reacción de los anticuerpos anti-*P. salmonis* con distintos tipos de muestras. Se observa reacción positiva a: *P. salmonis* obtenido de cultivo celular (A), cultivo celular con MEM-10 (B) y MEM-10 (F). Además se observa la ausencia de reacción cuando se enfrentan los anticuerpos con células de la línea celular CHSE-214 (C), homogeneizado de ova (D) y MEM (E).

5.3.2 Especificidad del segundo anticuerpo

El resultado demostró que existe una reacción del segundo anticuerpo con el cultivo bacteriano sin lavar.

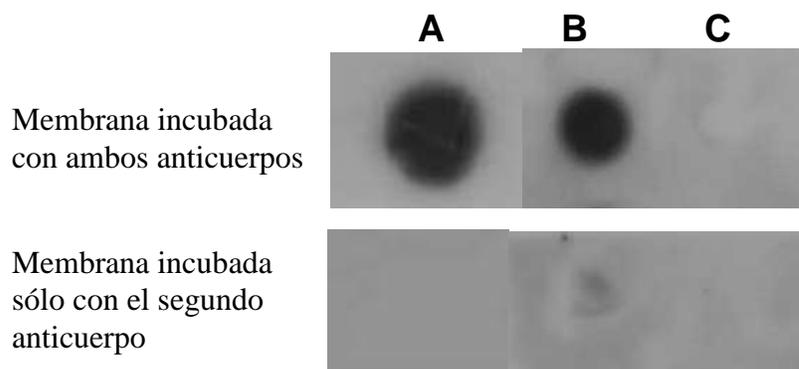


Figura 3: “Dot blot”. Las muestras de la columna A corresponden a *P. salmonis* lavadas con PBS. La columna B son muestras de la bacteria sin lavar (sobrenadante) y la C, es homogeneizado de ova de trucha arco iris. En la primera fila se observa la reacción cuando se enfrentan las muestras al anticuerpo primario y secundario, mostrándose reacción positiva sólo en los grupos con bacteria. En la segunda fila se aprecian los resultados obtenidos utilizando sólo el segundo anticuerpo, lo cual demuestra reacción con la bacteria sin lavar.

5.3.3. Sensibilidad del método

Los resultados indicaron una disminución progresiva de la reacción a medida que se diluía la cepa hasta la última dilución estudiada (Fig. 4).

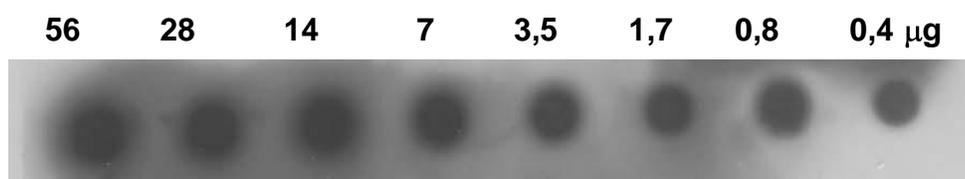


Figura 4: “Dot blot”. Diluciones de LF-89 con PBS, comenzando desde 56 μg de proteína se aprecia la disminución de la reacción de los anticuerpos hasta los 0,4 μg de proteína.

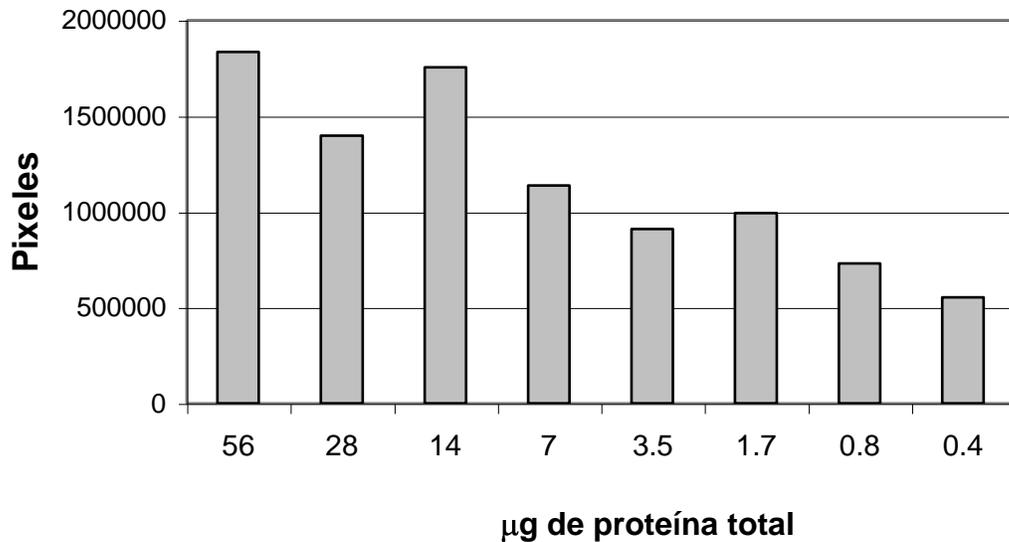


Gráfico 1: Diluciones de *Piscirickettsia salmonis* en PBS pH 7,4. Se aprecia una disminución del número de píxeles con relación a las diluciones seriadas de la bacteria desde los 56 hasta los 0,4 µg de proteína total.

El resultado de las diluciones 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} indica que la reacción positiva no se detecta a partir de los 0,28 µg de proteína total (Fig. 5).

28 2,8 0,28 0,02 µg



Figura 5: “Dot blot”. Diluciones de LF-89 con PBS. Se aprecia la reacción de los anticuerpos apreciándose señal positiva desde 28 hasta 2,8 µg de proteína total, no evidenciándose a partir de los 0,28 µg de proteína total.

Sin embargo, el resultado de las diluciones centrifugadas indica que continúa la reacción positiva hasta la última dilución estudiada (Fig. 6).

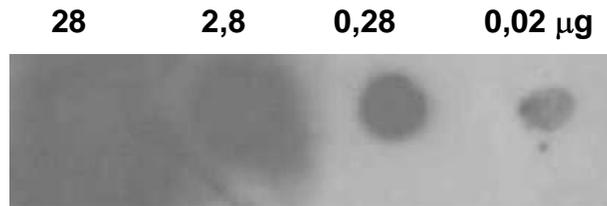


Figura 6: “Dot blot”. Diluciones de LF-89 con PBS, centrifugadas a 11.000 x g por 60 min. Se aprecia la reacción positiva desde 28 µg proteína total hasta la última dilución estudiada (0,02 µg proteína total).

5.3.4. Efecto de la denaturación

Los resultados indican que no existen diferencias entre una muestra natural y una desnaturalizada, ya sea de bacteria o de ova (Fig. 7).

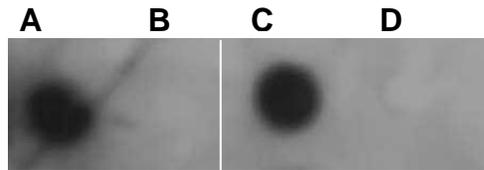


Figura 7: “Dot blot”. Reacción de los anticuerpos a las muestras de *P. salmonis* nativa (A) y desnaturalizada (C), lo que no se aprecia con el homogeneizado de ova natural (B) ni desnaturalizado (D).

5.3.5 Dilución más adecuada del primer anticuerpo

Los resultados indican reacción de los anticuerpos, estando el primer anticuerpo en forma concentrada (1:1.000) o diluido (1:10.000)

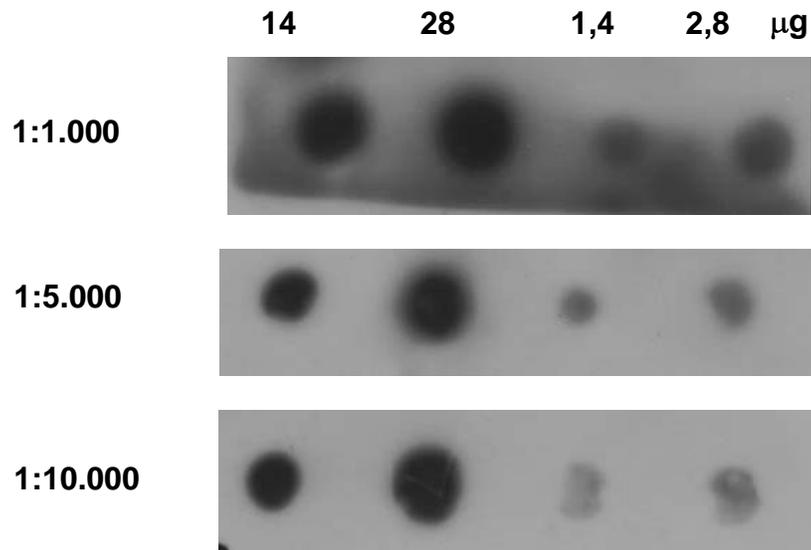


Figura 8: “Dot blot”. Reacción contra LF-89 a distintas diluciones del primer anticuerpo. En la primera fila se aprecia la membrana incubada con el primer anticuerpo diluido 1:1.000, en la segunda 1:5.000 y en la tercera fila 1:10.000. La reacción positiva se aprecia desde los 28 µg de proteína total (segunda columna) hasta los 1,4 µg de proteína total (tercera columna).

5.4 Cinética de la infección en ovas.

5.4.1 Cepa LF-89.

Se realizó la cinética de acuerdo al protocolo entregado en Material y Métodos (Punto 4.5). Los resultados indican la aparición de señal positiva desde 1 min de exposición de las ovas a la bacteria, la reacción positiva se mantiene hasta los 60 min.

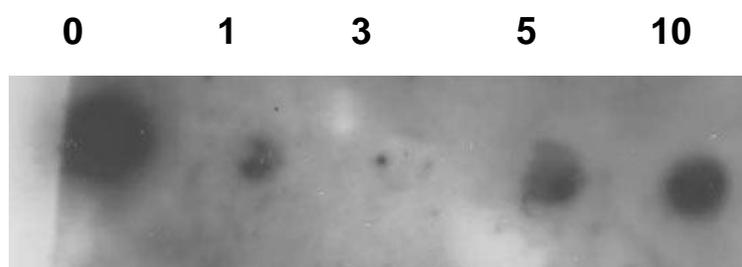


Figura 9: “Dot blot”. Cinética de la infección de *P. salmonis* cepa LF-89 en ovas de trucha arco iris (*O. mykiss*). Experimento donde se aprecia la reacción de los anticuerpos al inóculo bacteriano inicial (0) y a los homogeneizados de ovas expuestas a la bacteria durante 1, 3, 5 y 10 min.



Figura 10: “Dot blot”. Cinética de la infección de *P. salmonis* cepa LF-89 en ovas de trucha arco iris (*O. mykiss*). Reacción de los anticuerpos a los homogeneizados de ovas expuestas a la bacteria durante 1, 3, 5, 10, 30 y 60 min.

En el análisis densitométrico se aprecia una relación entre el tiempo de exposición de la ova al cultivo bacteriano y la señal positiva de la exposición a los anticuerpos.

Tabla 2: Número de píxeles de la reacción de los homogeneizados de ovas infectadas con *P. salmonis* cepa LF-89 a distintos tiempos y su relación en porcentaje con la carga inicial.

MUESTRA	Nº de PÍXELES	%
Carga inicial	462.457	100,00
1 min	31.324	6,77
3 min	41.439	8,95
5 min	38.076	8,22
10 min	51.822	11,20
30 min	76.797	16,59
60 min	72.884	15,76

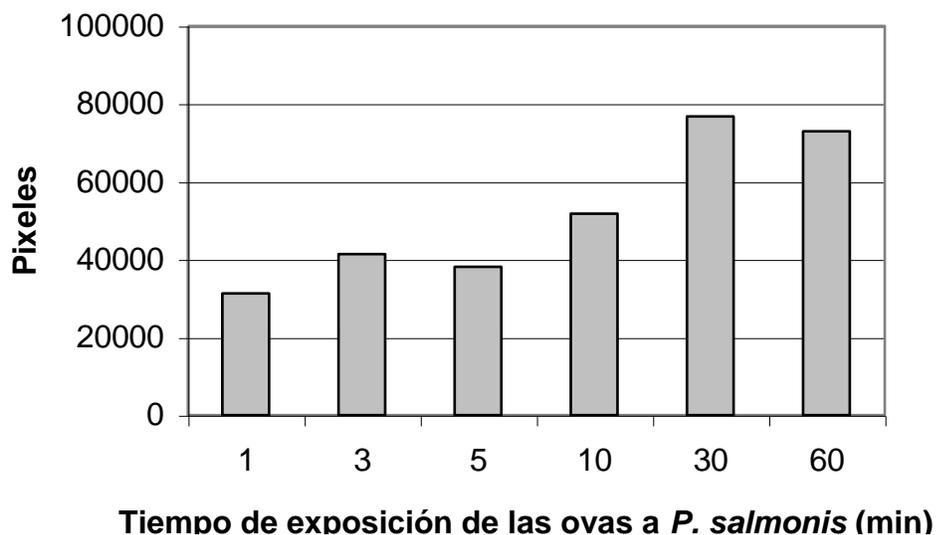


Gráfico 2: Cinética de infección de la cepa LF-89 a la ova de trucha arco iris (*O. mykiss*). Píxeles obtenidos por densitometría en relación con el tiempo de exposición de las ovas al cultivo bacteriano.

5.4.2 Cepa SLGO-95.

Los resultados indican la aparición de señal positiva desde 1 min de exposición de las ovas a la bacteria, lo que se mantiene hasta los 60 min.

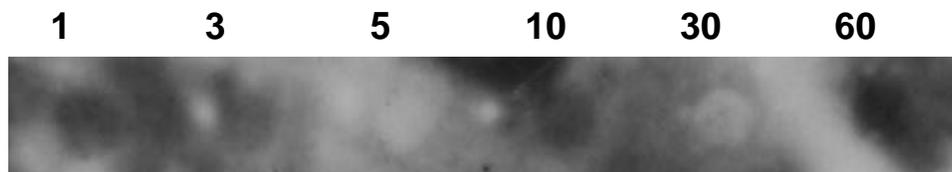


Figura 11: “Dot blot”. Cinética de la infección de *P. salmonis* cepa SLGO-95 en ovas de trucha arco iris. Reacción de los anticuerpos a los homogeneizados de ovas expuestas a la bacteria durante 1, 3, 5, 10, 30 y 60 min. Se evidencia reactividad a los 1, 3, 10 y 60 min.

Tabla 3: Número de píxeles de la reacción de los homogeneizados de ovas infectadas con *P. salmonis* cepa SLGO-95 a distintos tiempos y su relación en porcentaje con la carga inicial.

MUESTRA	Nº de PÍXELES	%
Carga inicial	628.667	100,00
1min	486.475	77,38
3 min	427.045	67,93
10 min	406.202	64,61
60 min	520.618	82,81

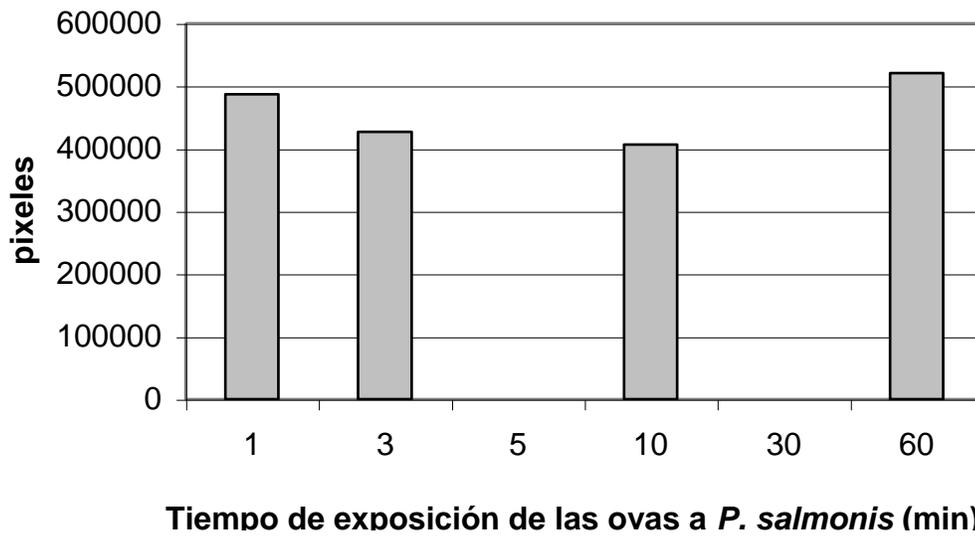


Gráfico 3: Cinética de infección de la cepa SLGO-95 a la ova de trucha arco iris (*O. mykiss*). Píxeles obtenidos por densitometría en relación con el tiempo de exposición de las ovas al cultivo bacteriano.

5.4.3 Comparación entre las cinéticas de las cepas LF-89 y SLGO-95 de *P. salmonis*.

Ambas cepas demostraron la capacidad de unirse a la ova de trucha arco iris a partir del primer minuto de exposición, reacción que se mantiene hasta el último tiempo estudiado (60 min). Sin embargo, la cepa SLGO-95 demostró un mayor número de píxeles, lo que indica que esta cepa se une a la ova en mayor cantidad.

Tabla 4: Comparación entre los porcentajes de infección de la ova con las cepas LF-89 y SLGO-95 de *P. salmonis*.

TIEMPO (min)	LF-89 (%)	SLGO-95 (%)
1	6,77	77,38
3	8,95	67,93
5	8,22	
10	11,20	64,61
30	16,59	
60	15,76	82,81

La prueba estadística de t-student para dos variables entrega como resultado un valor en la zona de rechazo, lo que significa que existen diferencias significativas entre las cinéticas de la infección de las ovas de trucha arco iris con los diferentes aislados de *Piscirickettsia salmonis*.

6. DISCUSIÓN

No existe información bibliográfica donde se ocupe el método “dot blot” asociado a quimioluminiscencia para detectar *Piscirickettsia salmonis*. Por lo tanto, en una etapa inicial fue necesario estandarizar el método.

Para el ensayo “dot blot” se ocupa el mismo primer anticuerpo que es utilizado en otras técnicas diagnósticas para *P. salmonis* como inmunofluorescencia e inmunoperoxidasa. De acuerdo a la bibliografía disponible, este anticuerpo oligoclonal es aparentemente específico contra distintas cepas de *P. salmonis* aisladas desde el sur del país, no presentando reacciones cruzadas contra otros componentes como las células CHSE-214 ni las ovas, lo cual es concordante con otros estudios (Jamett *et al.*, 2001).

En la presente memoria, en los estudios de especificidad del método se encontró reacción de los anticuerpos con el cultivo celular CHSE-214. Debido a que *P. salmonis* se desarrolla en la monocapa celular con MEM-10, fue necesario evaluar cada componente por separado para ver cual era el causante de la reacción positiva. Los resultados demostraron que la reacción se producía contra el cultivo celular con MEM-10 y contra el MEM-10, pero no contra el cultivo celular lavado con PBS. Por lo anterior aparece recomendable lavar adecuadamente la muestra de células antes de utilizarlas como control negativo, así como también lavar la muestra bacteriana. Estos resultados no concuerdan con la información descrita por Jamett *et al.* (2001) lo cual se podría deber a diferencias en la cantidad de proteínas o bien, al lavado con PBS de las muestras, lo que no se establece en el trabajo mencionado. De todas maneras, es importante mencionar que durante la producción de los anticuerpos monoclonales se haya producido una contaminación con el MEM-10 que posee dentro de sus componentes suero fetal bovino.

Para establecer cuál anticuerpo estaba reaccionando contra el MEM-10, se realizó el experimento de incubar distintas muestras sólo con el segundo anticuerpo, demostrándose que éste era el que reaccionaba. Sin embargo, su evaluación mediante densitometría fue menor que la suma de los dos anticuerpos en conjunto. Ello aparentemente estaría comprobando que ambos anticuerpos reaccionan con el suero fetal bovino.

Los resultados de las diluciones, donde se pierde la señal en la primera dilución (Fig. 5) sugieren que la bacteria no se distribuye homogéneamente en el medio.

Para ver si existían factores físicos que hicieran desaparecer los epitopos o aparecer nuevos epitopos, se sometieron las muestras a ebullición. Sin embargo, los resultados indicaron que no existían diferencias luego de este proceso (Fig.7).

Los experimentos de dilución del primer anticuerpo (Fig. 8) indicaron que había buena señal con el anticuerpo diluido 1:1.000, sin mucho “background”, sin embargo, ocupaba mucho anticuerpo y su manejo era complicado. También se obtuvieron buenos resultados con el anticuerpo diluido 1:10.000. Sin embargo, se seleccionó una dilución intermedia (1:5.000) para asegurar una señal positiva.

En el presente estudio se estableció la infección de las ovas de trucha arco iris con las cepas LF-89 y SLGO-95 de *P. salmonis* mediante la técnica de “dot blot” asociada a quimioluminiscencia. Los resultados de la cinética son concordantes con estudios anteriores donde se señala que mediante microscopía electrónica de barrido se aprecia la cepa LF-89 adherida a la superficie de la ova desde los 20 segundos de

exposición a la bacteria (Larenas *et al.*, 2003). En el mismo estudio, se observó la bacteria ingresando a la ova atravesando el corión desde el primer minuto de exposición, siendo más evidente a los 30 y 60 min. Además, se observó en una ova a la cual se le extrajo su membrana externa o corión, la presencia de la bacteria en el interior de la ova a los 5 min de exposición.

En un estudio experimental realizado por Larenas *et al.* (2003) se demostró en alevines provenientes de gametos de reproductores hembras y machos sanos, pero que fueron expuestos a la bacteria durante la fertilización, la presencia de *P. salmonis*, por lo que se sugiere que esta bacteria puede ingresar a los gametos durante este proceso.

Lannan y Fryer (1994) demostraron que la bacteria sobrevive pocos segundos en agua dulce, por lo que debe tener una estrategia que le permita ingresar rápidamente a la ova. El presente estudio apoyaría esta idea, de acuerdo a la aparición de infección desde el primer tiempo estudiado (1 min) para ambas cepas.

Cabe destacar que durante la ejecución de esta Memoria se efectuó un experimento donde se incubó durante 10 min una ova con bacteria muerta (hervida a 100°C durante 10 min), el cual no entregó resultado positivo a la incubación con los anticuerpos, lo cual señala que no hubo adhesión de la bacteria muerta a la ova y que la adhesión e ingreso de *P. salmonis* no es un proceso pasivo.

La cepa SLGO-95 demostró adherirse en mayor cantidad a la ova. Esto puede tener relación con estudios anteriores que señalan que este aislado es más virulento, ya que produce mortalidades mas altas y en menor tiempo con relación a la cepa LF-89 (Smith *et al.*, 1997). Además, esta cepa es más resistente a las terapias

antibacterianas (Smith *et al.*, 1996). Todo lo cual hacía suponer que SLGO-95 debería tener un comportamiento eficiente en cuanto a la adhesión e ingreso a diferentes tejidos, incluido la ova.

Cabe destacar que el presente estudio se hizo en paralelo a otra Memoria de Título (Quinteros, 2005) donde se realizó un estudio cinético, pero la unión de la bacteria a la ova se observó mediante microscopía de barrido, corroborando los resultados obtenidos, ya que se observó una mayor adhesión de la cepa SLGO-95 a la superficie de la ova.

Los resultados apoyan los estudios anteriores que indican que *Piscirickettsia salmonis* es capaz de infectar verticalmente las ovas y que esta sería una de las formas de transmisión del agente en la naturaleza.

7. CONCLUSIONES

- El método “dot blot” asociado a quimioluminiscencia es efectivo para detectar la infección de las ovas con *P. salmonis*.
- Existe un grado de reacción cruzada de los anticuerpos anti-*P. salmonis* comerciales utilizados en este experimento con el suero fetal bovino.
- Existe relación directamente proporcional entre el tiempo de exposición de las ovas a la bacteria y la magnitud de adhesión e ingreso a la ova de *P. salmonis*.
- Existe unión entre la bacteria y la ova desde el primer minuto de exposición a las cepas LF-89 y SLGO-95, lo que se mantiene, al menos, hasta el último tiempo estudiado (60 min).
- Las pruebas de “dot blot” demostraron que la cepa SLGO-95 se adhiere en mayor cantidad a la ova que la cepa LF-89.

8. BIBLIOGRAFÍA

- **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: 28-33.
- **BLANCO, M.C.** 1995. La trucha: cría industrial. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid.
- **BRAVO, S. y CAMPOS, M.** 1989. Síndrome del Salmón Coho. *Chile Pesquero* 54: 47-48.
- **BRAVO, S.** 1994. Piscirickettsiosis in freshwater. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* 14: 137-138.
- **CHEN, M.F.; YUN, S.; MARTY, G.D.; McDOWELL, T.S.; HOUSE, M.L.; APPERSEN, J.A.; GUENTHER, T.A.; ARKUSH, K.D.; HEDRICK, R.P.** 2000. A *Piscirickettsia salmonis*-like bacterium associated with mortality in white seabass, *Atractoscion nobilis*. *Dis. Aquat. Org.* 43: 117-126.
- **CVITANICH, J.D.; GARATE, O.N.; SMITH, C.E.** 1991. The Isolation of Rickettsia-like organism causing disease and mortality in Chilean salmonids and its confirmation by Koch's postulate. *J. Fish Dis.* 14: 121-145.
- **FRYER, J.L.; LANNAN, C.N.; GARCÉS, H.L.; LARENAS, J.J.; SMITH, P.A.** 1990. Isolation of a rickettsial-like organism from diseased coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) in Chile. *Fish Pathol.* 25: 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.
- **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.
- **GARRITY, G.M. y HOLT, J.G.** 2001. Roadmap to the manual. En: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol 1, 2nd edn.. Springer, New York. pp 155-166.

- **JAMETT, A.; AGUAYO, J.; MIQUEL, A.; MULLER, I.; ARRIAGADA, R.; BECKER, M.I.; VALENZUELA, P.; BURZIO, L.O.** 2001. Characteristics of monoclonal antibodies against *Piscirickettsia salmonis*. J. Fish Dis. 24: 205-215.
- **LANNAN, C.N.; WINTON, J.R.; FRYER, J.L.** 1984. Fish cell lines: Establishment and characterization of nine cell lines from salmonids. In vitro 20: 671-676
- **LANNAN, C.N. y FRYER, J.L.** 1991a. Recommended methods for inspection of fish for the salmonid rickettsia. Bull. Eur. Assoc. Fish Path. 11 (4): 135-136.
- **LANNAN, C.N.; EWING, S.A.; FRYER, J.L.** 1991b. A fluorescent antibody test for detection of the rickettsia causing disease in Chilean salmonids. J. Aquat. Anim. Health 3: 229-234
- **LANNAN, C.N. y FRYER, J.L.** 1994. Extracellular survival of *Piscirickettsia salmonis*. J. Fish Dis. 17: 545-548.
- **LARENAS, J.; HIDALGO, L.; GARCÉS, H.; FRYER, J.L.; 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.; GARCÉS, H.; FRYER, J.L.; SMITH, P.** 1996a. Rapid detection of *Piscirickettsia salmonis* using microwave irradiation. Fish Pathol. 31: 231-232.
- **LARENAS, J.; ASTORGA, C.; CONTRERAS, J.; SMITH, P.** 1996b. Detección de *Piscirickettsia salmonis* en ovas fertilizadas provenientes de truchas arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) experimentalmente infectadas. Arch. Med. Vet. 28: 161-166.
- **LARENAS, J.J.; CONTRERAS, J.; SMITH, P.** 1997. Efecto de la densidad poblacional y temperatura en trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) inoculadas con *Piscirickettsia salmonis*. Arch. Med. Vet. 29: 113-119.
- **LARENAS, J.J.; BARTHOLOMEW, J.; TRONCOSO, O.; FERNÁNDEZ, S.; LEDEZMA, H.; SANDOVAL, N.; VERA, P.; CONTRERAS, J.; SMITH, P.** 2003. Experimental vertical transmission of *Piscirickettsia salmonis* and in vitro study of attachment and mode of entrance into the fish ovum. Dis. Aquat. Org. 56: 25-30.

- **LARENAS, J.; ZAMORANO, E.; SMITH, P.** 2005. Detección de *Piscirickettsia salmonis* en heces de salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) infectados por transmisión vertical. Mon. Electr. Patol. Vet. 2 (1): 59-67.
- **LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J.** 1951. Protein measurement with the Folin's phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.
- **MAUEL, M.J.; GIOVANNONI, S.J.; FRYER, J.L.** 1996. Development of polymerase chain reaction assays for detection and differentiation of *Piscirickettsia salmonis*. Dis. Aquat. Org. 26: 189-195.
- **PIZARRO, I.** Evaluación experimental del efecto de condiciones de estrés en la presentación de piscirickettsiosis en trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*). Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias, 1998. 70 p.
- **QUINTEROS, J.** Comparación en la presentación del complejo de adhesión piscirickettsial entre dos cepas de *Piscirickettsia salmonis*. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias, 2005. 54 p.
- **REED, L.J. y MUENCH, H.** 1938. A simple method of estimating fifty percent endpoints. Am. J. Hyg. 27: 497-499.
- **RIVERA, A.** Alteraciones histopatológicas y detección de *Piscirickettsia salmonis* en gónadas de salmonídeos natural y experimentalmente infectados. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias, 1998. 55 p.
- **ROJAS, J.** Cinética de la infección de ovarios de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) por *Piscirickettsia salmonis* evaluada mediante inmunohistoquímica. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias, 2003. 94 p.
- **SALINAS, G.; CONTRERAS, J.; SMITH, P.; LARENAS, J.** 1997. Horizontal transmission and excretion of *Piscirickettsia salmonis* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in fresh water condition. En: VIIIth International Conference. Diseases of Fish and Shellfish. Abstracts Book. Heriot-Watt University, Edinburgh,. Eur. Assoc. Fish Pathol pp. P-57.

- **SMITH, P.A.; VECCHIOLA, I.M.; OYANEDEL, S.; GARCÉS, L.H.; LARENAS, J.; CONTRERAS, J.** 1996. Antimicrobial sensitivity of four isolates of *Piscirickettsia salmonis*. Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol. 16: 164-168.
- **SMITH, P.A.; ROJAS, M.E.; LARENAS, J.; CONTRERAS, J.; GUAJARDO, A.** 1997. Virulence comparison of three Chilean isolates of *Piscirickettsia salmonis*. En: VIIIth International Conference. Diseases of Fish and Shellfish. Abstracts Book. Heriot-Watt University, Edinburgh, Eur. Assoc. Fish Pathol. pp. P-056.
- **SMITH, P.A.; PIZARRO, P.; OJEDA, P.; CONTRERAS, J.; OYANEDEL, S.; LARENAS, J.** 1999. Routes of entry of *Piscirickettsia salmonis* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Dis. Aquat. Org. 37: 165-172.