



UNIVERSIDAD DE CHILE



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**“CARACTERIZACIÓN DE LA INTERACCIÓN DE
PISCIRICKETTSIA SALMONIS CON OVAS DE TRUCHA
ARCO IRIS (*ONCORHYNCHUS MYKISS*) SOMETIDAS A
TRATAMIENTOS CON PROTEASAS”**

NATALIA ANDREA TOLEDO PIZARRO

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

PROFESOR GUÍA: JULIO LARENAS HERRERA

SANTIAGO – CHILE
2008



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



“CARACTERIZACIÓN DE LA INTERACCIÓN DE *PISCIRICKETTSIA SALMONIS* CON OVAS DE TRUCHA ARCO IRIS (*ONCORHYNCHUS MYKISS*) SOMETIDAS A TRATAMIENTOS CON PROTEASAS”

NATALIA ANDREA TOLEDO PIZARRO

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

NOTA FINAL:

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA : JULIO LARENAS HERRERA
PROFESOR CONSEJERO: MARCO GALLEGUILLOS C
PROFESOR CONSEJERO: PEDRO SMITH Sch

SANTIAGO, CHILE
2008

Financiada por Proyecto Fondecyt 1030625

AGRADECIMIENTOS

Esta página tiende ser irremediamente un poco melancólica y no representan necesariamente las palabras correctas y reales, con lo que uno quisiera expresar el verdadero sentimiento que tenemos para los que realmente estuvieron cerca de nosotros, ya sea por la entrega de conocimientos, una palabra de apoyo o simplemente estar presente cuando se necesita.

Sin embargo y a pesar de lo dicho, es éste el espacio y el momento para agradecer a todas aquellas personas que fueron parte importante es esta larga y costosa tarea de volverme una profesional. Es por ello, que en ésta página quisiera dedicarla a mi familia, por su apoyo económico y estar a mi lado en los malos y buenos momentos.

A mis verdaderos amigos, por estar ahí cuando más los necesitaba, por su comprensión y paciencia, y por hacer de estos años los mejores.

Obviamente no dejar pasar, a las personas del laboratorio, Vero por su alegría y buena disposición y mis compañeros de tesis Carlos, Pablo, Jaque y Cata que ayudaron e hicieron mas grata la culminación de la tesis. Al doctor Julio Larenas, por presionarnos cuando la desidia nos superaba y para luego presionarnos a terminar lo antes posible este proyecto. Al doctor Marco Galleguillos por estar siempre presente en el desarrollo práctico de esta tesis y por su incalculable paciencia y buena disposición a enseñar.

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN.....	1
SUMMARY.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	5
A. Piscirickettsiosis y agente etiológico.....	6
B. Signos y lesiones.....	6
C. Vías de transmisión y epidemiología.....	9
D. Diagnóstico.....	14
E. Prevención y tratamiento.....	15
F. Estructura y composición del corion en peces.....	18
G. Enzimas.....	20
OBJETIVO GENERAL.....	22
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
MATERIAL Y MÉTODOS.....	23
A. Cinética de infección de ovas de trucha arco iris (<i>O. mykiss</i>) sometida a tratamiento con proteasas y posteriormente desafiadas con <i>P. salmonis</i>	25
A.1. Bacteria: <i>Piscirickettsia salmonis</i>	23
A.2. Ovas.....	24
A.3. Control negativo.....	25
A.4. Cinética de infección de las ovas de trucha arco iris con <i>P. salmonis</i>	25
A.4.1. Control de infección <i>P. salmonis</i>	25
A.4.2. Infección de ovas con <i>P. salmonis</i> previa exposición a PBS.....	25
A.5. Cinética de infección de las ovas de trucha arco iris (<i>O. mykiss</i>) sometidas a tratamientos con proteasas y posteriormente desafiadas con <i>P. salmonis</i>	26
A.5.1. Efecto de Tripsina sobre la superficie de las ovas y posterior desafío con <i>P. salmonis</i>	26
A.5.2. Efecto de Proteinasa K sobre la superficie de las ovas y posterior desafío con <i>P. salmonis</i>	26
B. Efecto de tratamientos enzimáticos sobre la superficie de ovas de trucha arco iris (<i>O. mykiss</i>).....	28
B.1. Control del efecto enzimático sobre las ovas.....	28

C. Control enzimas utilizadas.....	28
C.1. Tripsina.....	28
C.2.- Proteinasa K.....	29
D. Preparación muestras dot-blot.....	30
E. Metodología dot blot.....	31
F.-Determinación mediante la metodología dot blot de la cinética de infección de <i>P. salmonis</i> con ovas de trucha arco iris (<i>O. mykiss</i>)	32
G. Análisis de resultados.....	32
RESULTADOS.....	33
A. Control de las enzimas utilizadas.....	33
A.1 Tripsina	33
A.2 Proteinasa K	35
B. Efecto de tratamientos enzimáticos sobre la superficie de ovas de trucha arco iris (<i>O. mykiss</i>).....	36
C. Cinética de infección de ovas de trucha arco iris (<i>O. mykiss</i>) sometida a tratamiento con proteasas y posteriormente desafiadas con <i>P. salmonis</i>	37
C.1. Control positivo	37
C.2. Controles negativos	38
C.3. Cinética de infección de las ovas de trucha arco iris con <i>P. salmonis</i>	38
C.3.1. Control de Infección <i>P. salmonis</i>	38
C.3.2. Infección de ovas con <i>P. salmonis</i> previa exposición a PBS.....	39
C.4. Efecto de tripsina en la cinética de infección de <i>P. salmonis</i> sobre ovas de trucha arco iris.	40
C.5. Efecto de la proteinasa K sobre la superficie de las ovas y posterior desafío con <i>P. salmonis</i> viva.	42
D. Resumen cinética de infección de ovas de trucha arco iris (<i>O. mykiss</i>) sometida a tratamiento con proteasas y posteriormente desafiadas con <i>P. salmonis</i>	43
DISCUSIÓN.....	46
A. Control de las enzimas utilizadas y efectos de tratamientos enzimáticos sobre la superficie de ovas de trucha arco iris (<i>O. mikiss</i>).....	47
B. Cinética de infección de ovas de trucha arco iris (<i>O. mikiss</i>) sometidas a tratamientos con proteasas y posteriormente desafiadas con <i>P. salmonis</i>	48
C. Efecto de los tratamientos enzimáticos en la cinética de infección de <i>P. salmonis</i> sobre ovas de trucha arco iris (<i>O. mikiss</i>).....	49

CONCLUSIONES.....	54
BIBLIOGRAFÍA.....	55
ANEXO 1.....	60
A.- Homogeneizado de ovas	60
B.- Obtención de muestra final para uso en “dot-blot”	60
C.- Metodología “dot-blot”	63
ANEXO 2.....	64

RESUMEN

La salmonicultura es una actividad que hoy reporta al país importantes beneficios tanto económicos como sociales; convirtiendo a Chile en el segundo productor mundial de salmones. De ahí la importancia de mantener la sanidad de los peces en sus distintos estados de desarrollo y así reducir al mínimo las pérdidas por enfermedades. La piscirickettsiosis cuyo agente causal corresponde a *Piscirickettsia salmonis* es una de las principales enfermedades que afectan la salmonicultura nacional.

La presente memoria de título tuvo por objetivo caracterizar la interacción de *P. salmonis* con ovas de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) sometidas a tratamientos con proteasas y cuya técnica de detección fue “dot blot”.

La metodología “dot blot” no permitió comparar la eventual diferencia en la adhesión y/o penetración de la bacteria a la ova entre tripsina y proteinasa K. Por lo cual, esta técnica sólo se pudo utilizar como una técnica cualitativa para la detección de *P. salmonis*.

Mediante la técnica de “dot blot” se estableció que las ovas de trucha arco iris son sensibles a la infección con la cepa SLGO-95 de *P. salmonis*. Esta memoria también permite establecer que la estructura proteica del corion es afectada por las enzimas proteolíticas tripsina y proteinasa K. Además, dados los resultados obtenidos post-tratamientos enzimáticos, se considera que la unión entre ovas y *P. salmonis*, disminuye si se degradan estructuras proteicas, por lo tanto en esta unión implicaría partes proteicas o polipéptidos.

Finalmente estos resultados sugieren, pero no en forma concluyente en considerar la acción de proteínas o polipéptidos en la unión y posterior internalización de *P. salmonis* en el interior de la ova.

SUMMARY

Salmonid aquaculture industry is an activity that currently renders important economic and social benefits to the country, turning Chile into the second salmon producer world-wide. Therefore, it is crucial to maintain health in the different development states of the fish reducing to the minimum the losses by disease. Piscirickettsiosis, with causal agent corresponds to *P. salmonis*, is today one of the main diseases that affects the national salmon cultures.

The objective of this memory was to characterize the interaction of *P. salmonis* with rainbow trout (*O. mykiss*) egg, that were treated with proteases and whose detection technique was dot blot.

The dot blot methodology did not allow to compare the possible difference in the adhesion and/or penetration of the bacteria to the ova between trypsin and proteinasa K. Thus, this could only be used as a qualitative technique for the detection of *P. salmonis*.

The dot blot technique established that rainbow trout ovas are sensible to the infection *P. salmonis* type strain (SLGO-95). In addition, this memory allowed to establish that the protein structure of the chorion is affected by proteolytic enzymes, trypsin and proteinasa K. Also, given the results obtained after the enzymatic treatment, it is considered that the union between egg and *P. Salmonis*, diminishes if degrade protein structures, therefore this union would imply protein parts or polypeptides.

Finally, these results suggest, but they are not conclusive, in considering the action of proteins or polypeptides in the union and later penetration of *P. salmonis* into the egg.

INTRODUCCIÓN

Chile es hoy el segundo productor mundial de salmones, con una participación del 38,2% en el mercado mundial siendo Japón, Estados Unidos y la Unión Europea los mayores compradores. Esta industria entrega altos retornos económicos al país (SalmonChile Intesal, 2008). Hoy no sólo juega un rol económico, sino que también social manifestado por la dependencia de empleos que ella entrega. Mantener y cuidar esta actividad productiva se vuelve entonces de vital importancia y parte de este proceso lo compone la calidad sanitaria de los cultivos; y de ello reducir los costos y pérdidas por enfermedades.

Dentro de las enfermedades se encuentra la piscirickettsiosis; que corresponde a una de las con mayor relevancia en los centros de cultivos de salmónidos mantenidos en el mar al sur de nuestro país. Esta enfermedad en Chile tiene carácter endémico.

La piscirickettsiosis se presentó a partir del año 1989, en forma de brote. El agente etiológico corresponde a *Piscirickettsia salmonis* (Fryer *et al.*, 1992). La mayor dificultad de esta enfermedad radica en las altas pérdidas económicas debido a las mortalidades producidas 6 a 12 semanas después que los “smolts” son llevados a su fase marina de engorda y por los costos que significa su tratamiento con antibióticos.

Los mecanismos de transmisión aún no están claramente establecidos. Se ha descrito experimentalmente que esta bacteria puede penetrar por piel y branquias macroscópicamente indemnes (Smith *et al.*, 1999). En relación con la transmisión vertical, Larenas *et al.* (2003) demostraron que el agente se puede transmitir desde reproductores experimentalmente infectados machos y/o hembras a sus progenies; detectándose la bacteria en ovas al “estado de ojo” y alevines.

Mediante microscopía electrónica de barrido Larenas *et al.* (2003), demostraron experimentalmente que *P. salmonis* se adhiere a la superficie de ovas de trucha arco iris (*O. mykiss*), mediante prolongaciones, las cuales han sido denominadas: Complejo de Adhesión Piscirickettsial o CAP. Sin embargo, el mecanismo intrínseco y la participación receptores implicados en la unión y posterior penetración de la bacteria son desconocidos hasta la fecha.

De acuerdo a lo anterior, en la presente memoria se pretende establecer la eventual participación de receptores proteicos en la unión de la bacteria con el corion de ovas de trucha arco iris. Para ello; se utilizaron tratamientos con dos enzimas proteolíticas: proteinasa K y tripsina sobre la superficie de las ovas, para establecer si posterior a ello se alteraba la capacidad de adhesión de *P. salmonis*.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

El salmón fue introducido en Chile a principios del siglo veinte, pero recién en 1980 comenzó a ser cultivado en una escala significativa. Sin embargo, una vez que se dió inicio a la salmonicultura, el crecimiento de la industria no se detuvo más, posicionando a Chile en el segundo exportador mundial de salmónes. Esta industria es la exportación individual más importante de Chile después del Cobre; responsable de ingresos que superan los USD 1.500 millones. Actualmente, Chile participa en el 38,2% en la producción mundial de salmónes y truchas; cuyo principal mercado de exportación corresponden a Japón y EEUU (SalmonChile Intesal, 2008).

La industria, que hoy emplea a miles de personas, se ha convertido en un sector estratégico que mueve la economía de la Décima Región, mientras se expande aceleradamente en la Undécima y Duodécima regiones. Siendo la generación de empleos uno de los beneficios de la salmonicultura.

Por lo anterior, es importante mantener la sanidad de los peces cultivados y reducir las pérdidas por enfermedades. Entre ellas, se encuentra la piscirickettsiosis, enfermedad de carácter endémico y de mayor relevancia en los centros de cultivos de salmónidos mantenidos en el mar del sur de Chile. Debido a que la piscirickettsiosis causa en Chile altas mortalidades en fase de engorda; las pérdidas no sólo se limitan por esta variable, sino que también incluyen los costos en tratamientos con antimicrobianos. A pesar del uso de antibióticos, el control de la enfermedad no ha dado grandes resultados y los costos aumentan progresivamente. Se han intentado implementar vacunas para promover la inmunoprotección, pero los resultados han sido inconsistentes.

A.-Piscirickettsiosis y agente etiológico.

Los primeros brotes de esta enfermedad, se observan en 1989, en la Décima Región, provincia de Llanquihue, en la zona del “Canal de Huito”, en salmones coho (*Oncorhynchus kisutch*) cultivados por primera vez en balsas jaulas. A partir de esa fecha se registraron mortalidades de tipo crónicas del orden del 20 a 50%. En 1989 la enfermedad adquirió un carácter de epizootia al afectar centros de cultivos de Puerto Montt, Chiloé insular y continental, alcanzando mortalidades de hasta un 70% y en un caso particular la pérdida de toda la población. Hasta esa fecha se pensaba que sólo afectaba al salmón coho (Bravo y Campos, 1989). Inicialmente se denominó como “U.A.” (“Unidentified Agent”), “síndrome del salmón coho” y “enfermedad del Huito”. Posteriormente, se propuso el nombre de “septicemia rickettsial salmonídea” (SRS) por Cvitanich *et al.* (1991), por la naturaleza septicémica de la enfermedad. Hoy se conoce con el nombre de “piscirickettsiosis”, enfermedad producida por *P. salmonis* (Fryer *et al.*, 1992).

El agente causal corresponde a *P. salmonis* (Fryer *et al.*, 1992) el cual fue aislado inicialmente en Chile en el año 1989 por Fryer *et al.* (1990) y Cvitanich *et al.* (1991), desde salmones de cultivos afectados por altas mortalidades. Las nuevas clasificaciones taxonómicas la incluyen en el grupo de las Gammaproteobacterias; familia *Piscirickettsiaceae*, que comprende a un grupo de bacterias intracelulares obligadas que crecen en el citoplasma celular y ocasionalmente en el núcleo de células eucariontes. 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 pleomórfica y comúnmente aisladas desde ambientes marinos. Esta familia contiene 5 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).

Este patógeno es la única especie de su género y se caracteriza por ser gram negativo, aeróbico, inmóvil y no capsulado. Presenta una membrana externa ondulada y una interna citoplasmática. Su diámetro varía de 0,5 a 1,5 μm . Dentro de sus características se encuentra el ser pleomórfico, pero preferentemente en forma de bacilos cortos o cocos y se encuentra formando pares o anillos. Se reproduce por fisión binaria en vesículas citoplasmáticas en la célula hospedera (Fryer y Hedrick, 2003).

La bacteria se multiplica en varias líneas celulares de peces salmónidos y de algunos de aguas cálidas; produciendo en éstos un efecto citopático (ECP), con lisis celular completa y desprendimiento de la monocapa. *P. salmonis* crece *in vitro* en cultivos celulares de peces, libre de antibióticos luego de 10 días de incubación a 15°C produciendo el ECP. La más usada en laboratorios corresponde a la línea celular embrionaria CHSE-214 de salmón chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*) (Fryer *et al.*, 1990; Cvitanich *et al.*, 1991). El agente también se multiplica en otras líneas celulares, tales como: CHH-1 (*Oncorhynchus keta*), CSE-119 de salmón coho (*O. kisutch*), RTG-2 de trucha arco iris (*O. mykiss*), además de otras líneas de especies no salmónidos como, EPC (*Cyprinus carpio*), FHM (*Pimephales promela*), BF-2 (*Lepomis macrochirus Rafinesque*) y BB (*Ictalurus nebulosus*) (Cvitanich *et al.*, 1991; Almendras *et al.*, 1997)

Fryer *et al.* (1990) y Cvitanich *et al.* (1991) aislaron al organismo a partir de tejido renal infectado inoculando cultivos de seis líneas celulares, cuatro derivadas de salmónidos y dos desde peces de aguas cálidas. El crecimiento, determinado por el ECP sobre la monocapa de cultivos celulares, se observó después de 17 días de inoculación y no se observó en líneas celulares de peces de aguas cálidas, una de las cuales era la línea celular BB ("Brown Bullhead", especie *Ictalurus nebulosus*). Sin embargo Almendras *et al.* (1997) observaron la aparición de ECP luego de incubar 45 días *P. salmonis* (cepa VR 1361) en la línea celular BB.

Estudios realizados por Larenas *et al.* (1997), indican que la temperatura más favorable para reproducir la enfermedad en condiciones experimentales es de 14°C; lo cual es cercano a la temperatura óptima de replicación *in vitro* de la bacteria, que va entre los 15 a 18°C (Fryer *et al.*, 1990). Su multiplicación *in vitro* disminuye bajo los 10°C y sobre los 21°C. Se detiene sobre los 25°C (Fryer *et al.*, 1990).

Con respecto a los antígenos bacterianos, Barnes *et al.* (1998) establecieron la presencia de ocho proteínas antigénicas probablemente propias de *P. salmonis* (108, 95, 60, 56, 40, 36, 32 y 20 kDa). Los principales antígenos tendrían pesos moleculares de 56, 36 y 20 kDa. Kuzyk *et al.* (1996) señalaron seis antígenos principales, moléculas de 11, 16, 65, 60, 54 y 51 kDa.

B.-Signos y lesiones

La piscirickettsiosis es una enfermedad septicémica, en donde los principales tejidos afectados corresponden al hemapoyético renal, hígado, bazo e intestino. Entre los signos que se pueden observar se encuentran nado lento, errático y superficial; a veces en tirabuzón y orillamiento, los peces chocan contra las paredes de las balsas jaulas. También se puede observar letargia, anorexia y oscurecimiento de la piel (Larenas *et al.*, 1995)

Externamente se observan lesiones macroscópicas como nódulos y úlceras de distintos tamaños en la piel, descamación, equimosis, petequias en la base de las aletas y palidez branquial (Bravo y Campos 1989). Además se pueden observar pequeñas manchas blancas sobre el pez, algunos peces afectados muestran áreas de levantamientos a menudo hemorrágicas de 0,5 cm de diámetro o menos, estas lesiones van desde pequeñas placas blancas hasta úlceras hemorrágicas superficiales de aproximadamente 2 cm o más de diámetro. Algunos peces afectados no evidencian lesiones en la piel (Branson y Nieto, 1991).

La enfermedad causa una marcada anemia en que el hematocrito disminuye desde un 45% a 27% (Bravo y Campos 1989). A la necropsia se visualiza ascitis, renomegalia y esplenomegalia, pseudomembranas cardíacas, nódulos amarillentos subcapsulares en el hígado, hemorragias en estómago, hígado, ciegos pilóricos, vejiga natatoria, músculo y grasa visceral. El estómago a menudo se encuentra con un contenido mucoso amarillento. Histológicamente se observa inflamación y necrosis de distintos órganos y lesiones vasculares (Cvitanich *et al.*, 1991).

C.- Vías de transmisión y epidemiología.

Estudios realizados por Smith *et al.* (1996), demostraron que la bacteria puede afectar a todas las especies de salmónidos que se cultivan en Chile, tales como salmón del Atlántico (*Salmo salar*), salmón coho, salmón Chinook o Rey y trucha arco iris. La enfermedad por consiguiente, afecta a todas las especies de salmónidos cultivados en forma intensiva en Chile en fase de agua marina; aunque raramente se ha presentado en fase de agua dulce. Los signos clínicos se observan desde las 6 a 12 semanas después que los “smolt” son llevados al mar (Bravo y Campos, 1989). Los brotes ocurren principalmente en la época otoño-primavera, al parecer relacionado con la temperatura del agua, que en esa época varía entre los 9°C a 16°C (Lannan y Fryer, 1994).

Los mecanismos de transmisión aún no están claramente establecidos. Se ha descrito experimentalmente que truchas arco iris infectadas eliminan *P. salmonis* por medio de las heces, orina y bilis, las que podrían ser posibles vías de infección (Salinas *et al.*, 1997). Por otra parte, Smith *et al.* (1998) realizaron un estudio de infectividad de *P. salmonis* en truchas arco iris. Los grupos de salmónes fueron desafiados con la bacteria mediante distintas vías: intraperitoneal (IP), subcutánea (SC), parche en piel (PP), parche en branquias (PB), intubación gástrica (IG) e intubación intestinal (II). Las mortalidades acumuladas alcanzadas fueron 98% (IP),

100% (SC), 52% (PP), 24% (PB), 2% (IG) y 24% (II). Esto demuestra en forma experimental la entrada de *P. salmonis* a través de piel y branquias intactas, en ausencia de vectores. Como se evidenció experimentalmente, la inoculación subcutánea produce un altísimo porcentaje de mortalidad, esto indica que las lesiones de la piel facilitan la invasión con el agente patógeno y que los ectoparásitos podrían jugar un importante rol en la transmisión horizontal de la enfermedad. Los resultados obtenidos indican además, que la ruta oral puede no ser el normal método por el cuál *P. salmonis* inicia la infección en salmónidos

En estudios realizados por Cvitanich *et al.* (1991), demostraron la transmisión horizontal experimentalmente en salmones coho, mantenidos en acuarios tanto en agua dulce como salada, en ausencia de vectores. Lannan y Fryer (1994), determinaron que la supervivencia extracelular de *P. salmonis* en agua salada es relativamente prolongada; mayor a dos semanas, a una temperatura entre 5°C a 10°C. En cambio la viabilidad de la bacteria en agua dulce es limitada; esto explicaría el escaso número de brotes en la etapa de agua dulce.

Hallazgos de piscirickettsiosis en salmónidos cultivados en agua dulce, sugieren que este modo de transmisión ocurre en forma natural. Uno de ellos, se presentó en el Lago Llanquihue, en un grupo de peces provenientes de ovas importadas desde 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 los salmones enfermos en agua de mar (Bravo, 1994).

En otro caso, Gaggero *et al.* (1995) informaron del primer aislamiento de *P. salmonis* desde peces enfermos durante su fase de agua dulce. Los peces de salmón coho, del Atlántico y trucha arco iris fueron obtenidos de una epizootia; desde varias instalaciones de agua dulce localizadas en la isla de Chiloé, Décima Región. Las lesiones en los peces afectados fueron concordantes con las descritas

en los brotes de ambiente marino y las características de crecimiento *in vitro* del aislado correspondían a las de *P. salmonis*. El origen de la infección de estos salmónidos no fue posible determinarlo.

Con respecto a la posibilidad de vectores o reservorios marinos de la enfermedad; se determinó la presencia de la bacteria mediante inmunofluorescencia indirecta (IFAT), en el ectoparásito *Caligus sp*, y también en *Ceratothoa gaudichaudi* que es un parásito hematófago de peces. Además se ha observado en otras especies de peces como el jurel, róbalo, pejerrey y cabrilla; además en moluscos y crustáceos como choritos y picorocos, lo cual sugiere que podrían actuar como posibles reservorios o vectores marinos de la infección (Fryer *et al.*, 1990; Cvitanich *et al.*, 1991). En trabajos realizados por Venegas (1996) en especies silvestres que cohabitan con centros de cultivo marino, positivos a la enfermedad en la Décima Región de Chile, determinaron la presencia del agente en especies de peces nativos, crustáceos, moluscos y ectoparásitos artrópodos.

En estudios sobre la infectividad de *P. salmonis* en salmón coho y trucha arco iris, en el cuál, peces juveniles fueron inoculadas con la cepa LF-89, vía intraperitoneal; se obtuvo como resultado que la trucha arco iris es susceptible de ser afectada por piscirickettsiosis, y por lo tanto puede ser usada como animal de experimentación para modelos de estudio de piscirickettsiosis. Además se demostró que esta cepa, es patógena para ambas especies; sin embargo, el salmón coho es más susceptible a la cepa LF-89, ya que la DL_{50} y la DI_{50} en los salmones coho es menor. También se observó, la presencia de la bacteria en un importante número de peces clínicamente sanos de ambas especies, existiendo la posibilidad de que estos permanezcan como portadores del microorganismo y participar en la transmisión de la enfermedad (Contreras, 1995)

En otro estudio, en que se comparó la virulencia de tres aislados de *P. salmonis* utilizando truchas arco iris juveniles, se pudo reproducir experimentalmente la enfermedad. Estas presentaron los signos clínicos y lesiones macroscópicas

características de la piscirickettsiosis; además se realizaron frotis renales en el cuál se confirmó la presencia de *P. salmonis* mediante inmunofluorescencia. Al comparar dosis equivalentes entre los aislados, se observó que la cepa SLGO- 95 produjo significativamente las menores supervivencias, seguida de la cepa SLGO- 94 y finalmente de la cepa LF- 89; por lo tanto; los resultados indican que existe variación en la virulencia entre los distintos aislados de *P. salmonis*. Además se observó que SLGO-95 presenta una mayor resistencia a antibióticos (Rojas, 2000)

Aunque la existencia de transmisión vertical de piscirickettsiosis está confirmada durante el proceso de fecundación de las ovas en trucha arco iris, los mecanismos intrínsecos de este proceso aún se desconocen. En relación a ésta; Cvitanich *et al.*, (1991), demostraron la presencia de este patógeno en ovarios, fluido ovárico y testículos de peces afectados por la enfermedad. Larenas *et al.* (1996), inocularon reproductores de trucha arco iris obteniendo ovas al estado de ojo, positivas a la presencia de *P. salmonis*, sin embargo, no se demostró si a partir de esta etapa de desarrollo embrionario, se podían obtener alevines viables. En este mismo trabajo se observó que la bacteria puede encontrarse en abundante cantidad en fluido celómico y seminal. Además, en un trabajo no publicado, se ha corroborado la transmisión vertical en salmones coho naturalmente infectados (Zamorano, 2003).

Siguiendo la misma línea de investigación, se demostró experimentalmente la transmisión vertical mediante la inoculación de reproductores de trucha arco iris machos y hembras con *P. salmonis*. Se detectó mediante inmunofluorescencia indirecta la presencia de *P. salmonis* en muestras de semen y fluido celómico. La infección de alevines obtenidos se logró tanto cuando provenían de uno o ambos reproductores inoculados (alevines de saco ca 0,1 g y alevines de 1 g), pero ninguno manifestó signos clínicos de la enfermedad. Además, se obtuvieron ovas provenientes de hembras y machos sin infectar; estas ovas libres de bacterias fueron inoculadas por un tiempo determinado, con un medio que contenía una suspensión bacteriana de *P. salmonis*, lográndose luego de esto, progenies

positivas a la infección; demostrándose que la transmisión del agente puede ocurrir durante el proceso de fertilización. Y por lo tanto, que los fluidos ováricos y seminales pueden ser una importante fuente de *P. salmonis*; ya que al comparar la positividad de distintas muestras; los fluidos ováricos y seminales, presentaron una mayor positividad que las muestras de riñón. Además se demuestra la importancia de ambos progenitores en la transmisión vertical del agente.

Si bien no existe documentación de piscirickettsiosis en salmónidos reproductores en condiciones naturales; si se puede encontrar individuos positivos mediante IFAT de tejido renal en reproductores de cultivo. Esto hace suponer que estos peces si bien serían resistentes a la presentación de la enfermedad, podrían ser portadores asintomáticos del agente (Larenas *et al.*, 2002). Mediante microscopía electrónica de barrido, se demostró que la bacteria puede adherirse a la ova mediante unas prolongaciones, al parecer de la membrana externa del corion, las cuales se denominaron complejo de adhesión piscirickettsial o CAP, el cuál se une tempranamente a la ova. Aparentemente estas prolongaciones son inducidas por la presencia de la ova, ya que sólo se dirigen en esta dirección; además se observó que estas uniones también ocurrían entre bacterias. Se pudo observar también en este trabajo que las bacterias se encontraban en el interior de la ova ya al tiempo de 5 minutos post-exposición de la bacteria a la ova (Larenas *et al.*, 2002)

Los RLO's (rickettsia-like organisms) son un grupo emergente de patógenos y *P. salmonis* es el miembro más prominente de éste grupo. Se han reportado brotes de estos organismos similares a *P. salmonis* en Canadá del este, Noruega, Irlanda y Escocia. Se han encontrado estos organismos tanto en agua dulce como en agua salada, pero aun no se han caracterizado bien éstos organismos. Además se asoció a mortalidades en "white seabass" juveniles (*Atractoscion nobilis*), en el sureste de California, EEUU estas muertes se asociaron a infecciones producidos por organismos parecidos a *P. salmonis*, los signos coincidían con los de piscirickettsiosis. Estos se aislaron en dos líneas celulares, la

CHSE 214 de salmón Chinook y la línea WSBK de “white seabass” produciendo destrucción de la monocapa. Al ser inoculada vía intraperitoneal (IP); en salmones coho juveniles, la bacteria resultó ser altamente virulenta y el 80% de los salmones murieron de una septicemia hemorrágica. Aún así, la mortalidad de salmones coho son menores que las reportadas en Chile. Esta bacteria presentó diferencias antigénicas con *P. salmonis*. En este estudio se concluyó que los dos organismos están relacionados y que con eventos de aguas calientes, como la corriente de El Niño, han habido cruzamiento entre poblaciones de “white seabass” y salmones anádromos en California, ahora si la bacteria es transmitida por esta sobreposición de poblaciones no está claro (Chen *et al.*, 2000)

D.-Diagnóstico

En condiciones de terreno, la enfermedad es presuntamente diagnosticada en base a los signos clínicos descritos (Kent y Poppe, 1998). Para la identificación del agente existen distintas técnicas que entregan una aproximación diagnóstica a partir de frotis y cortes histológicos de tejidos como riñón, hígado y bazo; entre las cuales se pueden mencionar: las tinciones de Hematoxilina-Eosina (H-E), Giemsa, azul de toluidina y naranja de acridina (Fryer *et al.*, 1990; Larenas *et al.*, 1995).

Para la confirmación del patógeno existen pruebas serológicas como inmunofluorescencia indirecta (IFAT) (Lannan *et al.*, 1991) y la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que detecta, identifica y diferencia cepas de esta bacteria (Mauel *et al.*, 1996). Esta última técnica presenta una alta sensibilidad y especificidad y además permitiría la detección del agente en etapas tempranas de la infección, o desde peces asintomáticos que podrían actuar como portadores. Esta es capaz de detectar la presencia de ADN de *P. salmonis* amplificable a partir de pequeñas muestras como 5 µL o menos, de suero sanguíneo de peces.

La IFAT utiliza anticuerpos fluorescentes para la detección y diagnóstico de la enfermedad la cual presenta una alta sensibilidad y especificidad, además de ser un método simple y rápido de aplicar. Hoy en día es la técnica más usada en centros de cultivo de salmones. Esta técnica no requiere estrictas condiciones de asepsia. Las muestras se obtienen a partir de frotis de tejido renal o sanguíneo. La positividad de éstas se observarán al microscopio de fluorescencia como estructuras cocoides en forma de anillos de un color verde (Lannan *et al.*, 1991). Existe una modificación de ésta técnica realizada por Larenas *et al.* (1996a) en el cuál utilizando microondas disminuyeron los tiempos de incubación del 1º y 2º anticuerpo; obteniendo buenos resultados en la observación y según la técnica original, no existió variación en sensibilidad y especificidad.

También se utilizan técnicas inmunoenzimáticas que cuantifican la bacteria, tales como ELISA (Aguayo *et al.*, 2002). Sin embargo, en un estudio en que se comparaba IFAT con ELISA utilizando anticuerpos mono y policlonales, se demostró que las pruebas de ELISA presentaban una sensibilidad baja; además no se observó concordancia estadística entre los resultados obtenidos entre las pruebas diagnósticas (Díaz, 1999)

Como método definitivo de detección del agente se recomienda el aislamiento bacteriano a partir de frotis de tejido renal de peces infectados en líneas celulares libres de antibióticos hasta lograr el efecto citopático. Este es un método concluyente para la detección de *P. salmonis*, pero presenta distintos inconvenientes prácticos ya que las muestras deben ser tomadas asépticamente y mantenidas a 4°C. Debido a que las líneas celulares deben estar libres de antibióticos, el aislamiento resulta dificultoso ya que se produce una fácil contaminación. Otro inconveniente es el largo tiempo en lograr el efecto citopático, que puede ir desde 17 a 28 días a una temperatura de 15 a 18 °C (Fryer *et al.*, 1990; Cvitanich *et al.*, 1991).

E.- Prevención y tratamiento

Para disminuir las pérdidas en producción de salmones, por lo general los planteles productivos redujeron las densidades poblacionales por balsa jaula, como lo recomendaron durante los primeros brotes de piscirickettsiosis Bravo y Campos (1989), los que además recomendaron reducir los manejos durante brotes para evitar el estrés en los peces.

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 piscirickettsiosis. En este estudio se reporta el efecto concomitante de tres temperaturas diferentes del agua y dos densidades poblacionales sobre truchas arco iris inoculadas experimentalmente con *P. salmonis*. Los resultados 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. Se demostró con esto un efecto de sinergismo entre la temperatura de 14°C y la densidad poblacional de 20 k/m³ para desarrollar la enfermedad.

Es aconsejable además una pronta extracción de las balsas jaula, de peces moribundos y muertos. Esto es importante, ya que se ha demostrado el hecho de que peces moribundos eliminan una gran cantidad de la bacteria a través de orina, heces y bilis (Salinas *et al.*, 1997), sumado a la posibilidad de la entrada del agente infeccioso vía branquias y/o piel intacta (Smith *et al.*, 1998), hace que este simple manejo disminuya la posibilidad de transmisión horizontal.

De acuerdo a los resultados obtenidos por Larenas *et al.* (1996b), 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 piscirickettsiosis. Observando ovas infectadas mediante transmisión vertical con *P. salmonis*, se observa este microorganismo dentro el vitelo de la ova. Dado esto último, las medidas de desinfección de ovas serían ineficaces para la eliminación del patógeno (Larenas *et al.*, 1996b).

A principios de los años 90, los conocimientos sobre la respuesta inmune de los peces frente *P. salmonis* eran limitados. Para estandarizar los métodos de desafío, probando la eficacia de los métodos de vacunación, Smith *et al.* (1997) determinaron la dosis letal 50 y la dosis infectiva 50 en salmón coho y en trucha arco iris usando inyecciones IP de *P. salmonis*. En una prueba de campo, usando bacterinas de *P. salmonis* inyectadas intraperitonealmente en salmón coho pre-smolt, los peces fueron desafiados naturalmente ubicándolos en una zona endémica con piscirickettsiosis. Los resultados mostraron que algunos grupos de peces vacunados experimentaron menores mortalidades acumulativas que grupos de peces no vacunados sugiriendo una respuesta inmunoprotectiva en estos animales (Smith *et al.*, 1997).

La posibilidad de elaborar vacunas debiera ser una posible estrategia para controlar la piscirickettsiosis (Smith *et al.*, 1995), sin embargo, faltan mayores investigaciones en relación a la respuesta inmunoprotectiva que ellas pueden generar (Smith *et al.*, 1997).

Es importante tener en cuenta que las intensas lesiones necróticas de bazo y riñón, particularmente del tejido inmunopoyético renal, que se presentan en peces infectados con *P. salmonis*, sugieren que el sistema inmune estaría severamente afectado. Por esto, la enfermedad predispondría a la acción de otros agentes patógenos u oportunistas que podrían desencadenar cuadros de mortalidad multicausales. Además, el daño ocasionado a las células inmunocompetentes podría disminuir la eficacia de programas de inumoprofilaxis contra ésta u otras enfermedades en peces de cultivo (Larenas *et al.*, 1995).

Las efectividades de terapias antibióticas orales o inyectables no han estado dentro de lo esperado. Se cree que esto se debe al posible hecho de la aparición de resistencia en algunas cepas (Smith *et al.*, 1996b), y variabilidad en los tiempos y dosis de aplicación de las drogas. Se ha determinado, mediante la determinación de concentración mínima inhibitoria (CMI) de distintos antimicrobianos, que las cepas aisladas a mediados de los años noventa (SLGO-94 y SLGO-95) han mostrado una mayor resistencia a distintos antibióticos que las primeras cepas aisladas (LF-89 y EM-90).

La oxitetraciclina, el ácido oxolínico y la flumequina fueron usadas extensivamente por varios años en Chile para el tratamiento de piscirickettsiosis y por lo tanto una selección genética por parte de cepas resistentes pudo ser la razón de la pérdida de susceptibilidad a estos antibióticos por parte de *P. salmonis* (Smith *et al.*, 1996b). La determinación de CMI de antibióticos con posible uso terapéutico *in vitro*, es una primera aproximación para seleccionar drogas que actúen sobre el patógeno. Arriagada *et al.* (1996) aplicó la citometría de flujo en el estudio de la sensibilidad a antibióticos *in vitro* de *P. salmonis*. Este método es una alternativa más rápida, precisa y sensible para la determinación de CMI.

F.-Estructura y composición del corion en peces

En salmónidos, las primeras investigaciones con que se cuenta respecto a ovas de trucha arco iris, otorgan una primera aproximación de la posible composición proteica de éste.

Respecto a la biosíntesis, secreción y ensamblaje de materiales coriónicos; éste proceso es realizado por el ovocito durante su desarrollo; además éste participa en el proceso de fertilización, desde permitir el reconocimiento específico hasta prevenir la poliespermia. En relación a la estructura externa del corion o envoltura vitelina, Cotelli *et al.* (1988) reportaron que estaba formado principalmente por proteínas y glicoproteínas. En este trabajo, se purificó el corion maduro de *Carassius auratus*, determinándose que la ova está rodeado por un

recubrimiento acelular llamado corion y que este contendría aproximadamente 13,5 µg de proteína total; además de una variedad de al menos 20 polipéptidos de bajo y alto peso molecular (30 a 250 kDa), las que fueron clasificados en cinco clases, según su tamaño en el cuál las proteínas de 40 hasta 60 kDa representan la clase predominante, representando alrededor del 70% del total de proteínas del corion. En relación a la presencia de glicoproteínas como componentes del corion se encontraron cuatro bandas (46, 60, 84, 110 kDa). De acuerdo a Cotelli *et al.* (1988) se realizó una solubilización del corion y se determinó que éstos pueden ser parcial o totalmente disueltos por enzimas, además de agentes denaturantes. En algunos casos, la acción combinada de algunos de estos agentes solubilizan completamente las estructuras del corion en un corto tiempo de incubación a 100 °C. Además en ensayos con colagenasas se encontró que esta enzima digiere parcialmente preparaciones de corion frescos.

Brivrio *et al.* (1991) analizaron la composición macromolecular de distintos corion de trucha arco iris. El análisis de la purificación de estos mostró un patrón reproducible de cuatro componentes mayores de 129, 62, 54 y 47 kDa, representando aproximadamente el 80% del total de proteínas del corion. Posteriormente estas fracciones fueron sometidas a tratamientos de deglicosilación enzimática y sólo se observó que las fracciones de 129 y 47 kDa fueron glicosidados y se estableció que pertenecían a la familia de las glicoproteínas “asparagine-linked”. Además el mapeo peptídico realizado en aislados de polipéptidos muestra co-migración de fragmentos en SDS-PAGE. Estos resultados sugerirían que los cuatros principales polipéptidos del corion pueden ser parte de una característica estructural común del corion.

En otro estudio, realizado por Ha y Luchi (1997) en el que se extrajo y caracterizó la envoltura de ovas de trucha arco iris (*O. mykiss*), para observar el proceso de endurecimiento de estos huevos se estableció que las subunidades proteicas de huevos no fertilizados de trucha arco iris, consisten principalmente de 49, 56 y 65 kDa, y que al iniciarse el proceso de endurecimiento del corion, estas

subunidades disminuían gradualmente en cantidad y aparecían nuevas bandas de mayor peso molecular (123, 160 kDa y mayores a 250 kDa)

Estudios de Laser-Raman sobre la estructura del corion revelan la abundante conformación antiparalela de β -hoja plegada de las proteínas de huevos de trucha arcoiris (*O. mykiss*). Mediante técnicas de congelación y fractura permitieron la visualización directa de la arquitectura helicoidal del corion. Tirosinas (Thy) parecen actuar como aceptantes de hidrógeno, mientras que los residuos aromáticos fenilalanina (Phe) y el triptofano (Trp) son también constituyentes del corion (Hamodrakas *et al.*, 1987). Uniones disulfuro, junto con uniones isopeptídicas; son eslabones de las proteínas del corion de trucha arco iris que pueden encontrarse en todas las etapas de desarrollo del huevo. Además en este estudio se entrega información sobre los residuos de aminoácidos Cys, Tyr, Phe y Trp, formando parte de los aminoácidos del corion (Papadopoulou *et al.*, 1996).

En la presente memoria de título, se pretende obtener información del comportamiento de *P. salmonis* frente a cambios realizados en la estructura externa de la ova, que podrían alterar la adhesión y/o penetración de la bacteria a su superficie de la ova. Para ello se realizaron tratamientos sobre la superficie del corion de ovas de trucha arco iris, con dos enzimas proteolíticas con el fin de establecer si ello afectaba el proceso de adhesión de *P. salmonis*. Las enzimas que se eligieron en esta oportunidad fueron dos proteasas que actúan a distintos niveles de degradación proteica (proteínasa K y tripsina).

G.- Enzimas

Tripsina

La tripsina es una enzima que rompe los enlaces de las proteínas mediante hidrólisis para formar péptidos o aminoácidos de menor tamaño. El pH óptimo es 8 (rango de 7 a 9) y la temperatura óptima es 37 °C. Es una enzima específica ya

que hidrolisa al péptido en las posiciones del carboxilo terminal donde hay Arginina (Arg) o Lisina (Lys), ambos aminoácidos con grupos R cargados positivamente, fragmentando al péptido inicial (Sigma-Aldrich, 2008).

Proteinasa K

Proteinasa K presenta una amplia especificidad de sustrato. Degrada muchas proteínas nativas a péptidos, incluso en presencia de detergentes. Está aislada del hongo *Engyodontium album*, que es capaz de crecer sobre la queratina. El principal sitio de escisión es el péptido adyacente a alfa amino ácidos de grupos carboxilos alifáticos y aromáticos. Es comúnmente utilizada por su amplia especificidad. Su pH óptimo va desde 7.5-9.0 (rango de 7.5 a 12). La temperatura a la cual presenta mayor actividad es de 37 °C, pero es estable en una amplia gama de temperaturas (25 a 65 °C) (Sigma-Aldrich, 2008).

OBJETIVOS

Objetivo General

- Contribuir al conocimiento de la transmisión vertical de *P. salmonis* y los factores que afectan la cinética de penetración a la ova en peces salmonídeos.

Objetivos Específicos

- Determinar la capacidad de infección de *P. salmonis*, posterior a la degradación parcial de la superficie de ovas de trucha arco iris, al ser tratadas con enzimas proteolíticas.
- Comparar diferencias en la capacidad de infección de *P. salmonis*, posterior a tratamientos sobre superficie de ovas de trucha arco iris, entre tripsina y proteinasa K.

MATERIALES Y MÉTODOS

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

A.-CINÉTICA DE INFECCIÓN DE OVAS DE TRUCHA ARCO IRIS (*O. mykiss*) SOMETIDA A TRATAMIENTO CON PROTEASAS Y POSTERIORMENTE DESAFIADAS CON *P. salmonis*.

Se estableció un esquema de desafío en el cuál se usó un total de 16 ovas, subdivididas en distintos grupos. El volumen empleado de las distintas soluciones usadas para cada ova se estableció en 400 μ L; cantidad suficiente que lograba cubrir totalmente cada ova, éstas fueron colocadas en un tubo eppendorf con capacidad de 1 mL. La preincubación con las enzimas y los desafíos bacterianos se realizaron a una temperatura de 14 °C, la cual se mantuvo mediante una estufa refrigerada (Edilab, Santiago, Chile). El esquema de desafío completo se muestra en la tabla 1.

A.1. Bacteria: *Piscirickettsia salmonis*

Se utilizó la cepa SLGO-95 (Pasaje 10) (Smith *et al.*, 1996) de *P. salmonis*, aislada de salmón coho, la cual fue mantenida en nitrógeno líquido a -196°C . Para la multiplicación de la bacteria se usó la línea celular CHSE-214, las cuales fueron propagadas usando el medio esencial mínimo (MEM), libre de antibióticos, incubada a 17° C, según metodología establecida por Fryer *et al.* (1990).

La bacteria se utilizó una vez que se observó un efecto citopático cercano al 100%. El sobrenadante fue titulado mediante la dilución punto final en placa,

utilizando un título de 10^5 TCID₅₀/mL (dosis infectante de cultivo celular). La bacteria al ser usada en la cinética de infección fue previamente filtrada a través de un filtro Millipore® de 5 µm antes de ser utilizada en el experimento.

A.2. Ovas

Las ovas fueron obtenidas de reproductores hembras seleccionadas de trucha arco iris donadas por la empresa Marine Harvest Chile, libres de la infección por *P. salmonis*, *Renibacterium salmoninarum* y para el virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPN). Las ovas se transportaron en su propio fluido celómico dentro de una bolsa plástica, en un contenedor que las mantuvo a una temperatura aproximada de 4°C. Las ovas utilizadas se las evaluó mediante inspección externa, presentando un color anaranjado homogéneo, sin señales de sobremaduración (Figura 1).



Figura 1. Ovas maduras obtenidas desde hembras de trucha arco iris (*O. mykiss*) mediante frezado manual, las cuales presentan un típico color anaranjado homogéneo a la inspección externa.

A.3. Control negativo

Como control negativo se dispusieron 2 ovas sin infectar; las cuales fueron procesadas con el resto de las muestras para “dot blot”. Otro control que se cargó al “dot blot”, correspondió al MEM y a células del cultivo celular CHSE-214 sin infectar.

A.4. Cinética de infección de las ovas de trucha arco iris (*O. mykiss*) desafiadas con *P. salmonis*.

El estudio de la cinética de infección se subdividió en dos grupos:

A.4.1. Control de infección *P. salmonis*

Como control de infección de las ovas, un grupo de cuatro ovas fueron desafiadas con la suspensión bacteriana SLGO-95 de *P. salmonis* (A.1 de Materiales y Métodos). De éstas, dos ovas estuvieron en contacto con la bacteria por 5 min y las otras dos ovas por un tiempo de 10 min. Luego se eliminó la suspensión bacteriana y se realizaron dos lavados con 1 mL de solución “buffer” fosfato salino (PBS) (NaCl: 8,75 g/L; Na₂HPO₄ · 2 H₂O: 1,48 g/L; KH₂PO₄: 0,48 g/L; pH = 7,2). Finalmente, las muestras fueron congeladas a -14°C para posteriormente ser procesadas para la técnica “dot blot”.

A.4.2. Infección de ovas con *P. salmonis* previa exposición a PBS

Este segundo grupo correspondió a cuatro ovas, las cuales fueron sumergidas en una solución de PBS, por un tiempo de 5 min (como forma de pre tratamiento, al igual que lo establecido para las enzimas como se explica más adelante). Posterior a ello se realizaron dos lavados con 1 mL de PBS; para luego ser desafiadas con *P. salmonis* (10⁵ TCDI₅₀/mL), dos de ellas por 5 min y las otras dos por un tiempo de 10 min. Posteriormente las muestras fueron congeladas y posteriormente procesadas para “dot blot”.

A.5. Cinética de infección de las ovas de trucha arco iris (*O. mykiss*) sometida a tratamiento con proteasas y posteriormente desafiadas con *P. salmonis*.

A.5.1 Efecto de tripsina sobre la superficie de las ovas y posterior desafío con *P. salmonis*

De una concentración final de tripsina de 2 µg/µL (preparada en PBS pH 7,2), un grupo de cuatro ovas fueron tratadas con 16 µL diluida en 400 µL de PBS, por un tiempo de 5 min. Luego del tiempo de tratamiento de las ovas, se realizaron 2 lavados con PBS para eliminar la solución enzimática; posterior a ello, las ovas fueron desafiadas con una suspensión de *P. salmonis* (10^5 TCID₅₀/mL), dos ovas por 5 min y las otras dos ovas por un tiempo de 10 min (tabla1). Luego fueron lavadas dos veces con 1 mL de PBS. Posterior a esto las ovas fueron congeladas y luego procesadas para “dot blot”.

A.5.2 Efecto de proteinasa K sobre la superficie de las ovas y posterior desafío con *P. salmonis*.

Para este caso se utilizaron 20 µL de proteinasa K diluida en 400 µL de PBS. El procedimiento fue igual a lo descrito para tripsina (tabla 1).

Para interrumpir todos lo desafíos y como se describió anteriormente, se eliminó la suspensión bacteriana y se efectuaron los lavados en dos ocasiones con 1 mL de PBS. Luego las muestras fueron congeladas a -14 °C, para su posterior procesamiento. Como control de viabilidad de las cepas bacterianas, se inoculó una parte del sobrenadante bacteriano utilizado en esta experiencia, en la línea celular CHSE-214 para demostrar su posterior multiplicación a través de la formación de efecto citopático. También se realizaron tinciones de Giemsa e IFAT de la suspensión de desafío.

Tabla 1. Diseño experimental. Ovas pretratadas con tripsina o proteinasa K y posteriormente desafiadas con *Piscirickettsia salmonis* durante cinco y diez minutos.

MUESTRA		Pre-incubación		Lavado PBS (pH 7.2)		Cinética+PS (400 uL)		Detención (lavado PBS)		Dot Blot
		5 min		(X2)		5 min	10 min	(X2)		
1	Ova (O)					○	○	○	○	→
						○	○	○	○	
2	Ova + Tripsina (O+T)	○	○	○	○	○	○	○	○	→
		○	○	○	○	○	○	○	○	
3	Ova + Prot K (O+K)	○	○	○	○	○	○	○	○	→
		○	○	○	○	○	○	○	○	
4	Ova + PBS (O+PBS)	○	○	○	○	○	○	○	○	→
		○	○	○	○	○	○	○	○	

Ps: *P. salmonis*.

B.-Efecto de tratamientos enzimáticos sobre la superficie de ovas de trucha arco iris (*O. mykiss*)

B.1. Control del efecto enzimático sobre las ovas.

Es importante mencionar que el tiempo transcurrido desde que las ovas fueron extraídas de los reproductores y usadas en los experimentos, no fue mayor a 24 horas.

A un grupo de cinco ovas, se las trató con la misma concentración enzimática que se usó en el diseño experimental, con el fin de evaluar visual y externamente la existencia de cambios en la integridad, estructura, forma, color y tamaño de las ovas. Se utilizó un volumen de 400 μL /ova, los tiempos empleados se establecieron en 5 y 10 minutos.

C.-Control de las enzimas utilizadas

Para constatar la efectividad de la acción enzimática en las condiciones en que se mantuvieron las ovas, temperatura de incubación de la bacteria y la temperatura en la cuál se realizó la cinética de infección, se evaluó empíricamente la actividad proteolítica de tripsina y proteinasa K. Para ello, se utilizó como sustrato albúmina sérica bovina (BSA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), que posteriormente se evaluó a través de electroforesis en condiciones denaturantes SDS PAGE (Laemmli, 1970)

C.1. Tripsina

El trabajo se inició con la enzima tripsina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA); con la cuál se realizó una cinética de degradación utilizando como sustrato BSA, el cuál se evaluó posteriormente mediante electroforesis. El BSA fue usado a una concentración de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, y la tripsina a una concentración de 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (preparada en PBS pH 7,2). Se evaluó su actividad proteolítica en distintos

tiempos y a distintas temperaturas. Las temperaturas evaluadas fueron de 4°C, 21°C (temperatura ambiente). Para ello, se realizó una incubación en tubos eppendorf con BSA y tripsina, la degradación se evaluó a distintos tiempos, los cuales fueron: 5, 15, 30, 45, 60 min (excepto para la temperatura de 4°C, en el cual sólo se tomaron dos tiempos de 5 y 15 min). Se utilizó 100 µL de BSA y 4 µL de tripsina en cada cinética. Una vez transcurrido el tiempo previsto para cada muestra, se detuvo la reacción con buffer de muestra 4x (ver anexo 2) para luego, realizar la electroforesis. De cada muestra se cargaron 10 µL en cada pocillo del gel en la electroforesis.

Además, como control de la degradación, la enzima sola y BSA solo se cargaron 10 µL en los pocillos del gel de electroforesis. El esquema de trabajo se muestra en la tabla 2.

Tabla 2. Esquema en que se muestra la cinética de degradación de BSA con tripsina a distintos tiempos utilizando tres temperaturas.

Temperatura °C	Incubación BSA+ Tripsina (min)				
	5	15	30	45	60
4 °C	x	x			
21 °C	x	x	x	x	x

C.2.- Proteinasa K

En base al trabajo realizado con tripsina; se realizó el mismo experimento con proteinasa K (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). En este caso sólo se tomaron los tiempos de 5, 10 y 20 min. En tubos eppendorf se realizó una incubación con BSA al cual se le agregó la enzima por los tiempos ya descritos; estos mismos grupos fueron tratados a dos temperaturas de 8°C y 21°C (temperatura ambiente). Se utilizó 100 µL de BSA y 5 µL de proteinasa K. Se cargaron además la enzima sola y BSA solo como control de la degradación. Una vez transcurrido el tiempo previsto para cada muestra, la reacción se detuvo con

buffer de muestra para luego realizar la electroforesis, tomando de cada muestra 10 μ L que fueron cargadas en la electroforesis.

La enzima sola y BSA solo siguieron los mismos procedimientos que el resto de las muestras, como control de la degradación. En cada pocillo de electroforesis se cargó 10 μ L. El esquema de trabajo se muestra en la tabla 3.

Tabla 3. Esquema en que se muestra la cinética de degradación de BSA con proteinasa K a distintos tiempos y dos temperaturas.

Temperatura °C	Incubación BSA+ proteínas K (min)		
	5	10	20
8 °C	x	x	
21 °C	x	x	x

D.-Preparación muestras dot-blot

Luego de descongelar las ovas del diseño experimental a temperatura ambiente, éstas fueron procesadas mediante un método previamente estandarizado (Gatica, 2007), para posteriormente ser utilizadas en el “dot-blot”. El método constó básicamente en la homogeneización, centrifugación y resuspensión de la ova, como se muestra a continuación en el punto A.4 de Materiales y Métodos y se detalla en el anexo 1.

A las ovas desafiadas con distintas suspensiones se las sometió previamente a un procedimiento de homogeneizado, para que pudieran ser cargadas en el Biodot®. Cada ova se colocó en un tubo con una solución de homogeneizado en presencia de inhibidores de proteasas, para luego ser triturada y homogeneizada, dejándola así en condiciones de pasar al proceso de centrifugado. El procedimiento de homogeneizado se esquematiza en la figura 1 y se detalla en el anexo 1.

Luego los homogeneizados fueron centrifugados a 1.208 x g durante 20 min, a partir del cual se obtuvo una fracción sobrenadante (S1) y un precipitado

(P1). La fracción S1 se centrifugó a 11.427 x g por 60 min, resultando de este proceso un precipitado denominado P2 y un sobrenadante (S2). El sobrenadante S2 se utilizó como muestra para ser analizado mediante la metodología dot-blot. Este procedimiento detalla y esquematiza en el anexo 1.

E.-Metodología “dot blot”

Para realizar esta técnica se utilizó el BioDot (BioDot® Apparatus, BioRad) y una membrana de polivinildifluoruro (PVDF) (Inmun-Blot® PVDF Membrane for Protein Blotting 0,2 µm, BioRad). Las muestras a utilizar se colocaron en las celdas del BioDot, las cuales mediante el uso de vacío a través del aparato atravesaron la membrana PVDF. Posterior a esto, la membrana se bloqueó hasta el siguiente día a 4 °C, en una solución de TBS-leche-Tween 20 (Tris-HCl 20nM pH 7,6, NaCl 137nM, leche descremada 6% y Tween 20® 0,005%), con el fin de evitar una interacción inespecífica de anticuerpos con proteínas contaminantes. A continuación las membranas fueron sometidas a 3 lavados con agitación, en una solución de TBS-tween 20 durante 10 min cada uno. Luego se incubó por 2 h con un primer anticuerpo (IgG de ratón) anti-*P. salmonis* (“Kit” SRS Fluorotest Indirecto®, BiosChile®) en una solución TBS-leche-Tween 20; en una dilución de 1:5.000. Posteriormente se realizó una segunda etapa de lavado con agitación como ya se ha descrito anteriormente. Luego durante 1 h con un segundo anticuerpo anti-IgG de ratón (Anticuerpo InmunoPure®, Pierce®) conjugado a peroxidasa HRP (Peroxidasa de Rabanita), en solución de TBS-leche-Tween 20, cuya dilución fue de 1:10.000. Finalmente se realizó una última etapa de lavado, para luego revelar con un sustrato quimioluminiscente (SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate, Pierce®). La reacción positiva se evidenció indirectamente por la presencia de puntos luminosos, cuya intensidad de luz estuvo en directa relación con la cantidad de antígenos bacterianos presentes en la muestra. Luego, la membrana fue expuesta durante 35 min a películas fotosensibles (CL-X Posure®, Pierce®), con el fin de registrar las diferencias de intensidad de luz de cada muestra. Posteriormente se realizó la determinación

cuantitativa de la intensidad de los puntos, mediante un análisis densitométrico. La metodología “dot blot” se basó en el protocolo que se detalla en el anexo 1.

F.-Determinación mediante la metodología “dot blot” de la cinética de infección de *P. salmonis* con ovas de trucha arco iris (*O. mykiss*)

Esto se realizó mediante la estandarización de la metodología “dot blot” (Gatica, 2007), para la detección de *P. salmonis*. La muestra a cargar correspondió al sobrenadante 2 (S2) de la metodología “dot blot”.

G.-Análisis de resultados

Respecto al análisis de resultados del “dot blot”, la reacción quimioluminiscente entre la peroxidasa del segundo anticuerpo y el sustrato quedó registrada en la película radiográfica, indicando la presencia de *P. salmonis* en la muestra. Para analizar los resultados se carga en el BioDot 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. El pixelaje del resto de las muestras se expresó como porcentaje de adhesión e ingreso a la ova con respecto a la carga bacteriana inicial. Se realizó un análisis descriptivo con relación al tiempo y el porcentaje de adhesión e ingreso a las ovas. Los controles negativos también fueron evaluados como ovas completas.

RESULTADOS

A.-Control de las enzimas utilizadas

Cabe recordar como se indicó en el punto B de materiales y métodos, al no contar con información respecto a experimentos similares con ovas de trucha arco iris, bacterias y las enzimas usadas, se realizó un perfil de electroforesis para evaluar la degradación de las distintas enzimas (E) y obtener un patrón adecuado a utilizar. Es así como se procedió a degradar el BSA con las 2 enzimas (tripsina y proteinasa K a distintos tiempos y a distintas temperaturas. Esta degradación se muestra más adelante; en la cual se puede observar que, al primer tiempo empleado de 5 min ocurre degradación del BSA en las 3 temperaturas empleadas para tripsina y proteinasa K.

A.1.Tripsina

Los resultados de la electroforesis muestran que al tiempo de 5 min existe una degradación completa del BSA (mismo tiempo empleado en la cinética de degradación, material y métodos A.3) con las 2 temperaturas utilizadas. Además se pudo observar que a las distintas temperaturas y tiempos empleados, no se observan grandes diferencias de degradación del BSA en la electroforesis. Estos resultados, se pueden observar en las figuras 2 y 3.

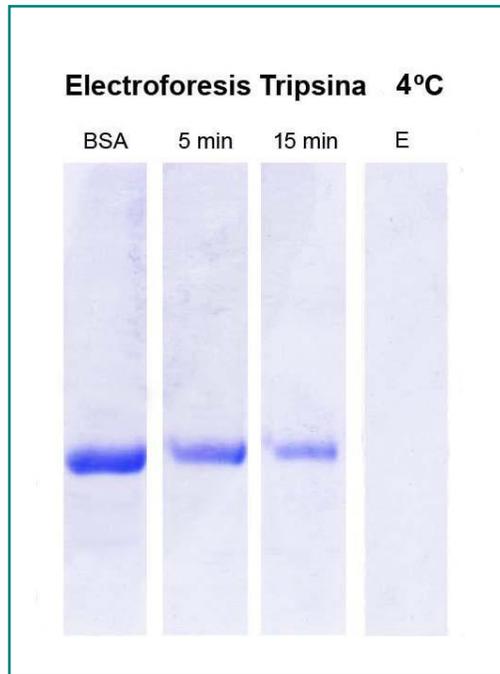


Figura 2. SDS PAGE. Muestra de degradación de BSA a 4 °C, mediante electroforesis, en distintos tiempos de exposición de degradación de tripsina junto a BSA.
 BSA: albúmina sérica bovina.
 E: enzima tripsina.

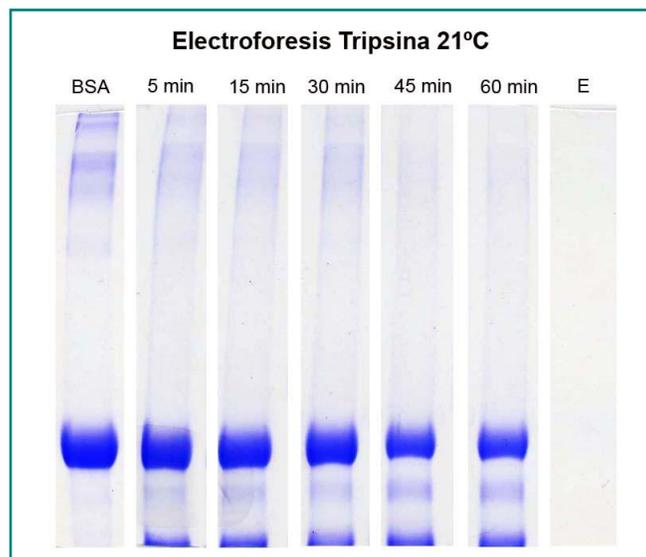


Figura 3. SDS PAGE. Muestra de degradación de BSA a 21 °C, mediante electroforesis, en distintos tiempos de exposición de degradación de tripsina junto a BSA.
 BSA: albúmina sérica bovina.
 E: enzima tripsina.

A.2. Proteinasa K

En las siguientes figuras (4 y 5) se puede observar que al tiempo de 5 min, ocurre una degradación completa del BSA, al igual que en los tiempos de 10 min y 20 min; en los cuales no se observa ninguna banda. Esto ocurre en igual forma para las dos temperaturas empleadas.

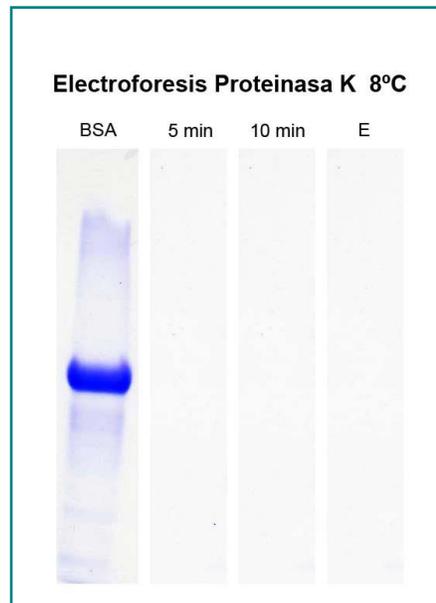


Figura 4: DSD PAGE. Muestra de degradación del BSA con proteinasa K a 8 °C, mediante electroforesis, en distintos tiempos de exposición de degradación de proteinasa K junto a BSA. BSA: albúmina sérica bovina. E: enzima proteinasa K.

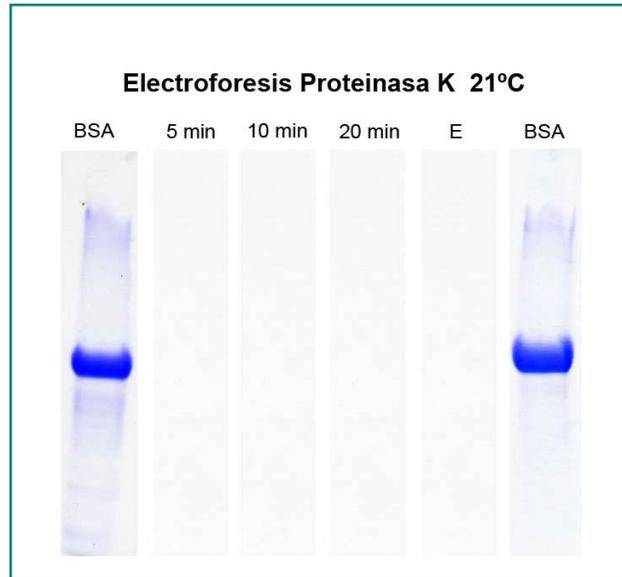


Figura 5: SDS PAGE. Muestra de degradación del BSA con proteínasa K a 21 °C, mediante electroforesis, en distintos tiempos de exposición de degradación de proteínasa K junto a BSA. BSA: albúmina sérica bovina. E: enzima proteínasa K.

B.- Efecto de tratamientos enzimáticos sobre la superficie de ovas de trucha arco iris (*O. mykiss*)

Como se mencionó anteriormente en el punto A.2 de material y métodos, las ovas fueron obtenidas de reproductores hembras seleccionadas de trucha arco iris (*O. mykiss*). Las ovas utilizadas se las evaluó inicialmente mediante inspección externa, presentando un color anaranjado homogéneo, sin señales de sobremaduración. Este grupo de ovas sometidas a acción enzimática, al ser evaluadas en forma visual externa, se observó que en el tiempo de 5 min la ova no sufría un deterioro observable a simple vista con el tratamiento con tripsina y proteínasa K. Tampoco se observó cambios macros en las ovas al tiempo de 10 min al tratar con tripsina. Sin embargo, si se observaron cambios estructurales al tiempo de 10 min en ovas tratadas con proteínasa K, en el cual se pudo apreciar un cambio en su coloración, tornándose algunas mas blanquecinas y algunas de ellas se rompieron, perdiendo su estructura típica redondeada original.

C.- Cinética de infección de ovas de trucha arco iris (*O. mykiss*) sometida a tratamiento con proteasas y posteriormente desafiadas con *P. salmonis*

Como ya se indicó en material y métodos (punto A.2), las muestras usadas en estas experiencias corresponden a ovas de trucha arco iris desafiadas con la cepa SLGO-95 de *P. salmonis*.

C.1. Control positivo

La muestra de bacteria usada en el desafío (SLGO-95), fue cargada como control positivo de la detección de *P. salmonis*. Ésta generó positividad en la película expuesta a la membrana PVDF a los 35 min de exposición, como se muestra en la figura 7.



Figura 7. "Dot blot". Muestra de cultivo celular (CHSE-214) infectada con la cepa SLGO-95 (pasaje 10) de *P. salmonis*, sometida a "dot-blot". Se observa el punto de positividad generado por la bacteria usada como desafío de ovas de trucha arco iris. Película expuesta a la membrana PVDF durante 35 minutos.

CI SLGO-95: suspensión bacteriana filtrada de botella de cultivo celular infectado con la cepa SLGO-95 de *P. salmonis*, usada durante el desafío de ovas de trucha arco iris.

Mediante el análisis densitométrico, con el software Un-ScanIt, se demostró que la muestra SLGO-95 presentó una positividad expresada en píxeles de 190.840.

C.2. Controles negativos

Los controles negativos, correspondientes a las muestras de las ovas sin infectar, MEM y células embrionarias de cultivo celular CHSE-214, fueron negativos a la detección de *P. salmonis* mediante la metodología “dot blot”.

C.3. Cinética de infección de las ovas de trucha arco iris con *P. salmonis*

Como se indicó en el punto A.3, ésta se subdividió en dos grupos:

C.3.1 Control de Infección *P. salmonis*

Como se explicó en punto A.3 de materiales y métodos, se estableció un grupo de ovas como control de infección, esta muestra mediante análisis densitométrico generó positividad al tiempo de 10 minutos de desafío de la bacteria con la ova, sin embargo al tiempo de 5 minutos no se observó positividad en la película al ser expuesta durante 35 min a la quimioluminiscencia de la membrana PVDF (figura 8). Estos resultados se muestran en la tabla 6, gráfico 1.



Figura 8. “Dot blot”. Cinética de infección de ovas desafiadas con *P. salmonis*. Durante 5 y 10 min. La película fue expuesta por 35 min. Se observa positividad sólo a los 10 min.

C.3.2 Infección de ovas con *P. salmonis* previa exposición a PBS

Estas muestras generaron positividad al “dot blot”, en los dos tiempos de desafío de las ovas a la bacteria, como se observa en la figura 9. Mediante análisis densitométrico se observó el pixelaje generado por ambas muestras que se pueden observar en la tabla 4, gráfico 1.



Figura 9. “dot blot”. Cinética de infección de ovas de trucha arco iris con *P. salmonis* a dos tiempos de exposición. Como preincubación se utilizó PBS por 5 min y luego las ovas fueron desafiadas con la bacteria por tiempos de 5 y 10 min. La película fue expuesta por 35 min, ambas muestras generaron positividad.

Tabla 4. Cinética de infección de ovas de trucha arco iris con *P. salmonis* a dos tiempos de exposición. Las ovas fueron desafiadas con la bacteria por tiempos de 5 y 10 min. Estos grupos se subdividieron en dos grupos. El primero corresponde a ovas sin pretratamiento, las cuales sólo fueron desafiadas con la bacteria por los dos tiempos descritos y el segundo grupo correspondió a un grupo de ovas las cuales fueron pretratadas PBS por 5 min y luego las ovas fueron desafiadas con la bacteria por tiempos de 5 y 10 min. La película fue expuesta por 35 min.

Muestra	Cinética de infección de las ovas de trucha arco iris	
	SLGO de <i>P. salmonis</i> .	
	5 min	10 min
O (s/tto)*	-	96.625
O+PBS**	236.947	129.044

*O (s/tto). Ova desafiada con cepa de *P. salmonis* (pasaje 10) durante 5 y 10 min.

**O+ PBS. Ova desafiada con cepa de *P. salmonis* (pasaje 10) durante 5 y 10 min, posterior a efecto de PBS sobre su superficie durante 5 min.

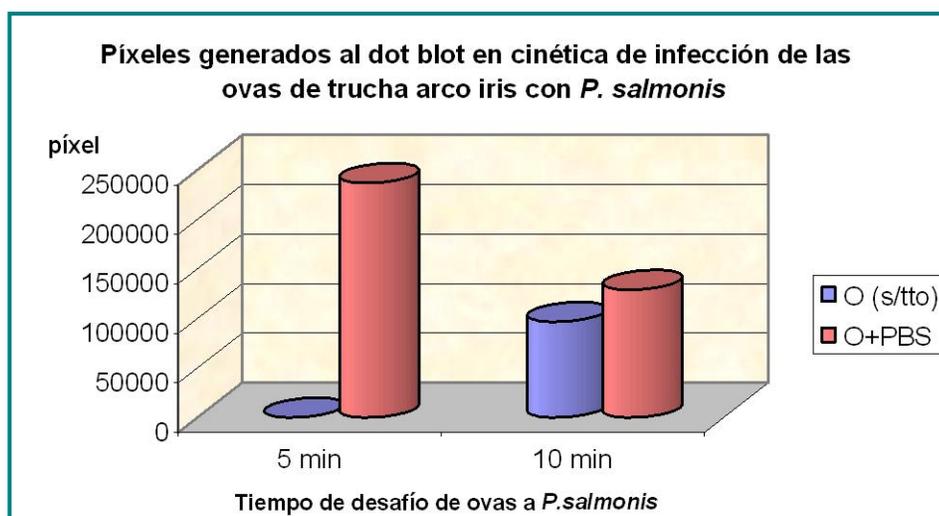


Gráfico 1. Píxeles generados por cinética de infección del control de infección O (s/tto) en dos tiempos de exposición a la bacteria, y píxeles generados por cinética de infección de ovas de trucha arco iris con *P. salmonis* a dos tiempos de exposición en que se usó como preincubación PBS por 5 min y luego las ovas fueron desafiadas con la bacteria por tiempos de 5 y 10 min. Para ambos grupos la película fue expuesta por 35 min.

C.4. Efecto de tripsina en la cinética de infección de *P. salmonis* sobre ovas de trucha arco iris.

Como se indicó en el punto A.5.1 (Materiales y Métodos) las ovas pretratadas con tripsina por 5 min, para luego ser desafiadas con *P. salmonis* a los dos tiempos estudiados, 5 y 10 minutos de desafío, mostraron positividad en los dos tiempos de desafío (figura 10). Mediante análisis densitométrico se observa que al tiempo de 10 min de exposición de la ova a la bacteria el pixelaje fue mayor. Esto se observa en la tabla 5, gráfico 2

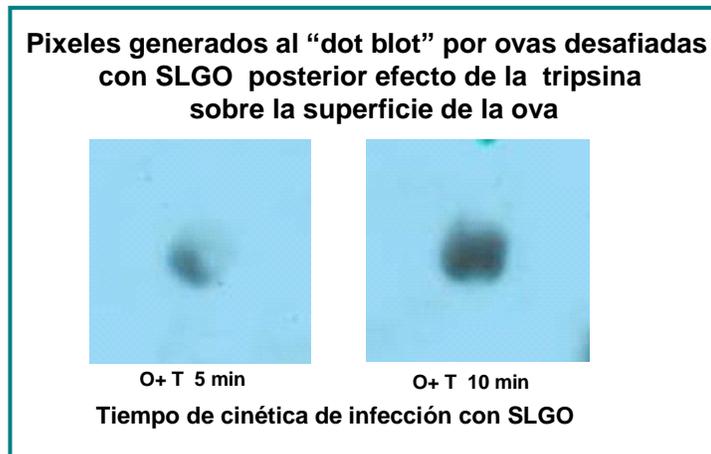


Figura 10. “dot blot”. Muestras de ovas pretratadas con tripsina y posteriormente desafiadas con *P. salmonis* durante 5 y 10 min. La película fue expuesta por 35 min. Ambas muestras generan positividad.

Tabla 5. Píxeles generados posterior al efecto de tripsina sobre la superficie de las ovas y posterior desafío con *P. salmonis*, muerta por 35 min de exposición de la película a la membrana PVDF.

Muestra	Cinética de infección de las ovas de trucha arco iris con cepa SLGO de <i>P. salmonis</i>	
	5 min	10 min
	O+T	35.406

O+ T. Ova desafiada con cepa de *P. salmonis* (pasaje 10) durante 5 y 10 min, posterior a efecto de tripsina sobre su superficie durante 5 min

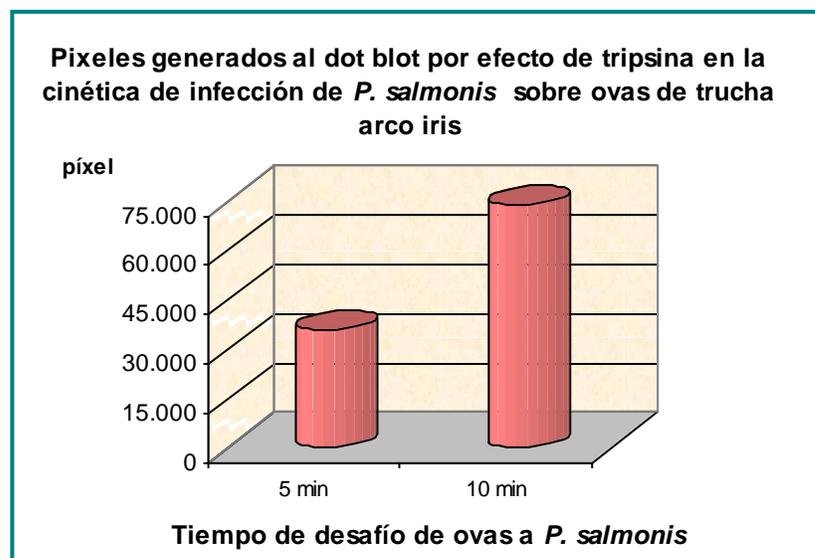


Gráfico 2. Píxeles generados por el efecto de la tripsina sobre la superficie de la ova y posterior desafío con *P. salmonis* en dos tiempos (O+T), a los 35 min de exposición a membrana PVDF.

C.5. Efecto de la proteinasa K sobre la superficie de las ovas y posterior desafío con *P. salmonis*.

Las muestras de ovas que se pretrataron con proteinasa K, para luego ser desafiadas con *P. salmonis*, por los tiempos de 5 y 10 minutos de exposición de las ovas a la bacteria, generaron positividad en la película expuesta a la membrana PVDF a los 35 min de exposición, como se muestra en la figura 11. Esta vez, mediante densitometría, se observó que al tiempo de 5 min los píxeles generados fueron mayores que a los 10 min, como se visualiza en la tabla 6, gráfico 3.

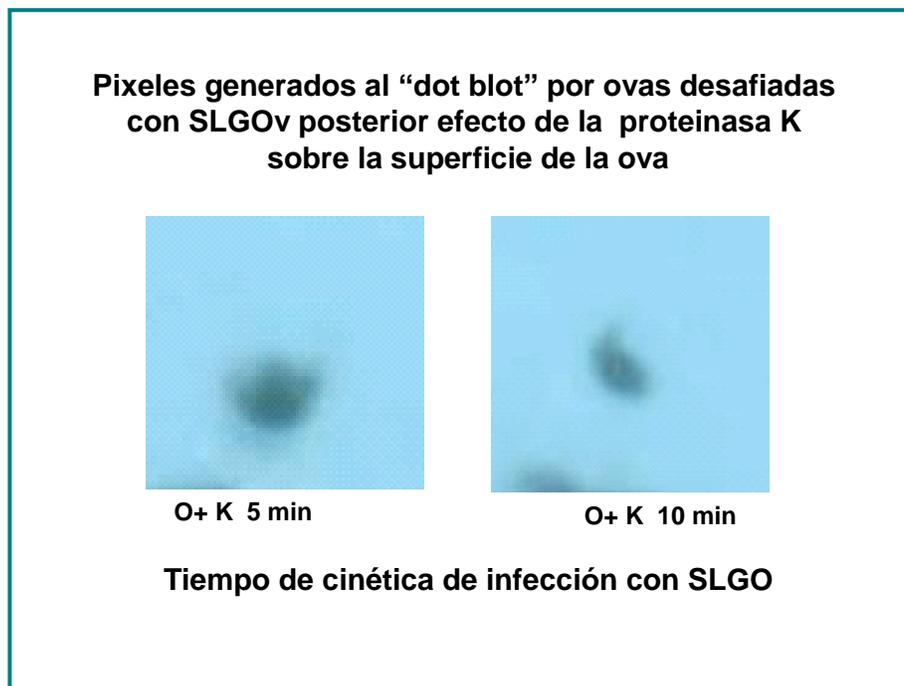


Figura 11. “Dot blot”. Muestras de ovas pretratadas con proteinasa K las cuales posteriormente se desafiaron con *P. salmonis* durante 5 y 10 min. La película fue expuesta por 35 min. Ambas muestras generan positividad.

Tabla 6. Píxeles generados al “dot blot” posterior efecto de proteinasa K sobre la superficie de las ovas y luego desafiadas con *P. salmonis* por dos tiempos, a los 35 min de exposición de la película de a la membrana PVDF.

Muestra	Cinética de infección de las ovas de trucha arco iris	
	SLGO	
	5 min	10 min
O+K	46.347	33.630

O+ K. Ova desafiada con cepa de *P. salmonis* (pasaje 10) durante 5 y 10 min, posterior a efecto de proteinasa K sobre su superficie durante 5 min.

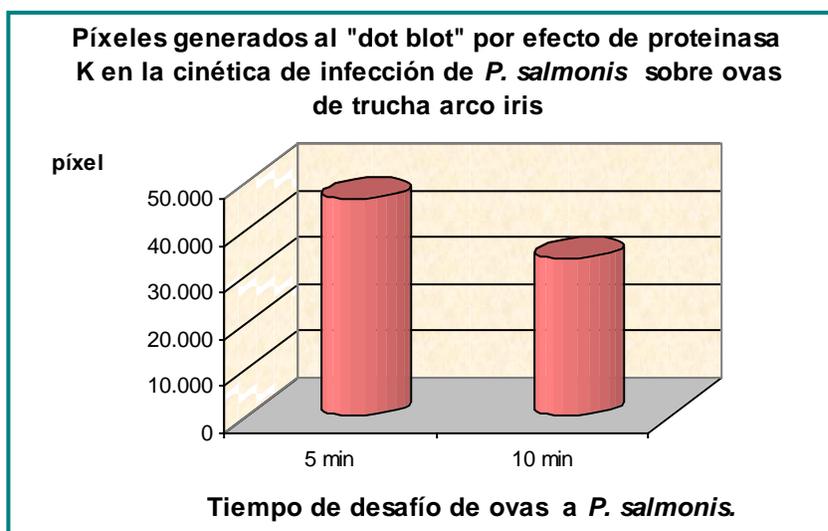


Gráfico 3. Píxeles generados por el efecto de la proteinasa K sobre la superficie de la ova y posterior desafío con *P. salmonis* en dos tiempos (O+K), a los 35 min de exposición a membrana PVDF.

D.- Resumen cinética de infección de ovas de trucha arco iris (*O. mykiss*) sometida a tratamiento con proteasas y posteriormente desafiadas con *P. salmonis*.

Tabla 7. Cinética de infección de ovas de trucha arco iris con *P. salmonis* viva y muerta. Las ovas fueron desafiadas con la bacteria por tiempos de 5 y 10 min. El primer grupo corresponde a ovas a las cuales se las desafío directamente con la suspensión bacteriana, el segundo grupo corresponde a ovas pretratadas con PBS por 5 min para luego exponerla a la bacteria. Los grupos siguientes corresponden a las ovas pretratadas con las proteasas por 5 min, las que posteriormente se desafiaron con la bacteria. La película autorradiográfica fue expuesta por 35 min.

Muestra	Pixelaje cinética de infección de las ovas de trucha arco iris con <i>P. salmonis</i> .	
	5 min	10 min
O (s/tto)*	-	96.625
O+PBS**	236.947	129.044
O+T	35.406	73.846
O+K	46.347	33.630

*O (s/tto). Ova desafiada con cepa de *P. salmonis* (pasaje 10) durante 5 y 10 min.

**O+ PBS. Ova desafiada con cepa de *P. salmonis* (pasaje 10) durante 5 y 10 min, posterior a efecto de PBS sobre su superficie durante 5 min.

O+ T. Ova desafiada con cepa de *P. salmonis* (pasaje 10) durante 5 y 10 min, posterior a efecto de tripsina sobre su superficie durante 5 min

O+ K. Ova desafiada con cepa de *P. salmonis* (pasaje 10) durante 5 y 10 min, posterior a efecto de proteinasa K sobre su superficie durante 5 min

Tabla 8. Cinética de infección de ovas de trucha arco iris con *P. salmonis* expresada como porcentaje de la carga inicial. Las ovas fueron desafiadas con la bacteria por tiempos de 5 y 10 min. El primer grupo corresponde a ovas a las cuales se las desafió directamente con la suspensión bacteriana, el segundo grupo corresponde a ovas pretratadas con PBS por 5 min para luego exponerla a la bacteria. Los grupos siguientes corresponden a las ovas pretratadas con las proteasas por 5 min, las que posteriormente se desafiaron con la bacteria. La película fue expuesta por 35 min.

Muestra	% 5 min	% 10 min
CI SLGO-95	100	100
O (s/tto)*	-	50,63
O+PBS**	124,16	67,61
O+T	18,55	38,69
O+K	24,28	17,62

*O (s/tto). Ova desafiada con cepa de *P. salmonis* (pasaje 10) durante 5 y 10 min.

**O+ PBS. Ova desafiada con cepa de *P. salmonis* (pasaje 10) durante 5 y 10 min, posterior a efecto de PBS sobre su superficie durante 5 min.

O+ T. Ova desafiada con cepa de *P. salmonis* (pasaje 10) durante 5 y 10 min, posterior a efecto de tripsina sobre su superficie durante 5 min

O+ K. Ova desafiada con cepa de *P. salmonis* (pasaje 10) durante 5 y 10 min, posterior a efecto de proteinasa K sobre su superficie durante 5 min

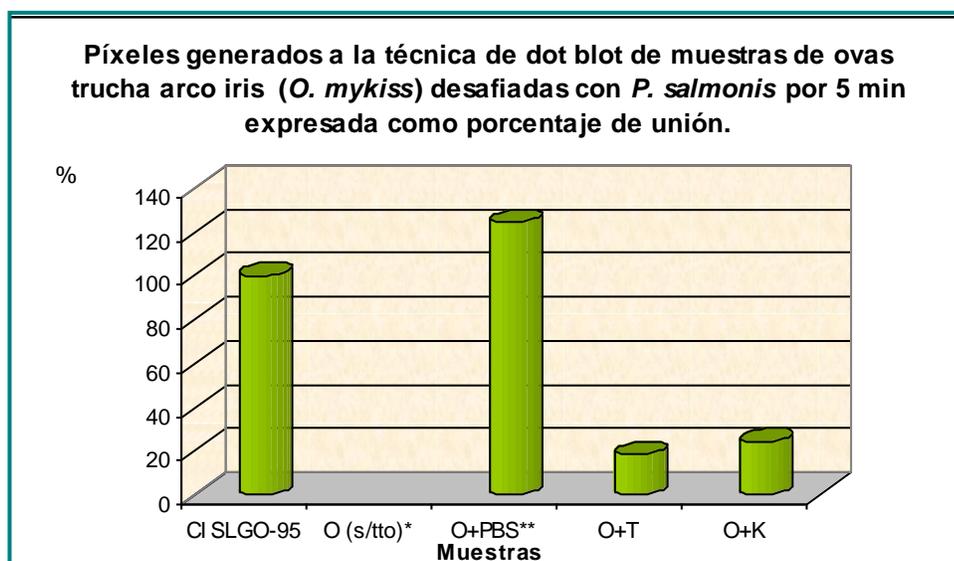


Gráfico 3. Porcentaje de píxeles generados por cinética de infección de ovas de trucha arco iris con *P. salmonis*, a los 5 min de desafío, respecto a la carga inicial. La película fue expuesta por 35 min.

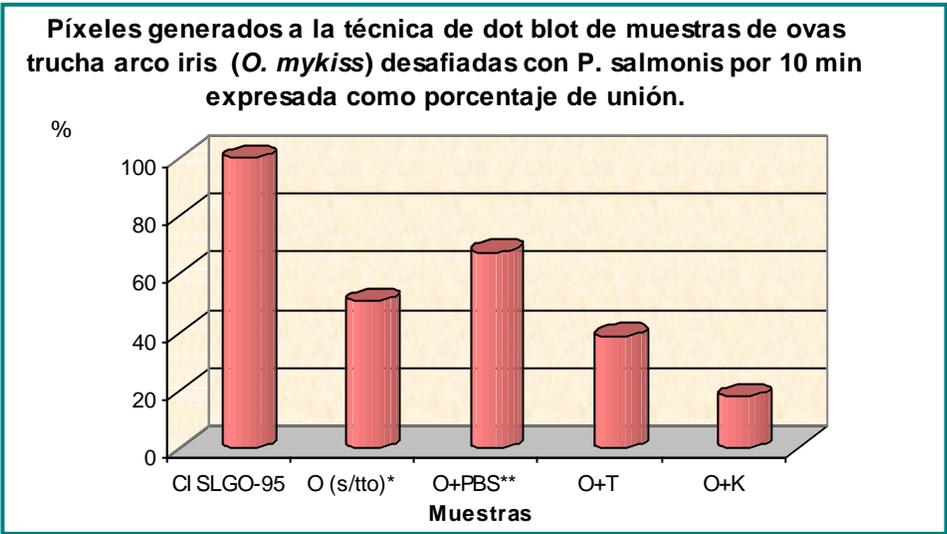


Gráfico 4. Porcentaje de píxeles generados por cinética de infección de ovas de trucha arco iris con *P. salmonis*, a los 10 min de desafío, respecto a la carga inicial. La película fue expuesta por 35 min.

DISCUSIÓN

Las ovas de trucha arco iris usadas en ésta memoria de título fueron aportadas por Marine Harvest Chile S.A. y enviadas desde un centro de cultivo de la Décima Región, el tiempo transcurrido desde que fueron frezadas hasta su utilización en los experimentos no superó las 24 h. Las ovas fueron empacadas con el fluido celómico de las propias hembras frezadas, para preservar su estado y colocadas dentro de una bolsa plástica que fue sellada posterior a la introducción de oxígeno en su interior para permitir oxigenación de las ovas. Las bolsas fueron transportadas a una temperatura aproximada de 4° C durante todo el trayecto. Éste método de transporte y de mantención de las ovas permite obtener buenos resultados en la fertilización *in vitro* inclusive hasta las 48 h post-desove (Blanco, 1995). El criterio de selección de ovas a partir del “pool”, se basó en la observación de ciertas características como: color anaranjado intenso y homogéneo, translúcido y sin presencia señales de precipitación. Estas características indicarían la buena calidad de las ovas del punto de vista macroscópico de acuerdo a lo descrito previamente por Blanco (1995), lo cuál es importante para obtener resultados experimentales reproducibles.

Puesto que, no existen muchos estudios sobre la detección de *P. salmonis* mediante la metodología “dot blot”, el presente trabajo es la continuación de una serie de experimentos y parte de un proyecto relacionado con la estandarización del método, realizado previamente (Gatica, 2007) que fue la primera experiencia de esta técnica para la detección de esta bacteria. Mediante esta metodología y esta memoria de título se buscó caracterizar la interacción de *P. salmonis* con ovas de trucha arco iris, posterior al tratamiento de estas ovas con enzimas proteolíticas.

A.- Control de las enzimas utilizadas y efecto de tratamientos enzimáticos sobre la superficie de ovas de trucha arco iris (*O. mykiss*)

Con el fin de establecer la actividad enzimática y la cantidad más apropiada a utilizar con las ovas de trucha arco iris, se realizaron una serie de experimentos preliminares. De esta manera, se evaluó la efectividad de las enzimas a distintas temperaturas, y además se observó la cantidad y tiempo adecuado en el cual se sumergiría la ova como pre-tratamiento. Fue así que, en un primer paso utilizando como sustrato BSA, se realizaron cinéticas de degradación del mismo expuesto a tripsina y proteinasa K, a diferentes tiempos y temperaturas. De los resultados obtenidos, se observó que las enzimas tenían un buen comportamiento en cuanto a degradación del BSA en las distintas temperaturas empleadas (fig 3, 4, 5, 6 y 7).

Las ovas tratadas con enzimas, con tiempos mayores a 5 min sufrían cambios observables a simple vista en cuanto a color y estructura, observados principalmente con la enzima proteinasa K. Por lo tanto, según los resultados el tiempo establecido para el tratamiento de éstas no fue mayor a 5 min.

De acuerdo a lo anterior, Iwamatsu *et al.* (1995) observaron los cambios de las proteínas del corion de huevos no fertilizados de *Oryzias latipes* por digestión enzimática. Para ello, sumergieron los corion de ovas no fertilizadas en distintos tipos de enzimas entre ellas tripsina y quimiotripsina al 0,25% por 30 min a 23 °C, esto mostró por SDS-PAGE que las capas internas del corion fueron digeridas.

B.- Cinética de infección de ovas de trucha arco iris (*O. mykiss*) sometida a tratamiento con proteasas y posteriormente desafiadas con *P. salmonis*.

B.1. Controles.

Con los resultados obtenidos en los dot-blot realizados en la presente memoria de título, se comprobó que las ovas desafiadas fueron susceptibles a la infección con la cepa SLGO-95 de *P. salmonis*. Durante todos los experimentos realizados, se comprobó que la técnica dot-blot es capaz de detectar la presencia de *P. salmonis*, y que los controles negativos generaron los resultados esperados, (ova no desafiada, MEM y el cultivo celular CHSE-214).

Para el caso del control con PBS utilizado para observar y comprobar que el medio en el cual se encontraban las enzimas no afectaría la infección. Los resultados obtenidos fueron dispares y no esperados. Puesto que en experiencias anteriores realizadas en la estandarización del método, el PBS fue cargado como control en el “dot blot” y no generó positividad en ningún caso.

El pixelaje que generó la muestra control positivo de infección con *P. salmonis* denominada “CI SLGO-95”¹, fue menor a lo esperado respecto a lo observado hasta la fecha en suspensiones bacterianas filtradas desde botella, en comparación con lo generado en experimentos realizados previamente como parte de la estandarización del método (Gatica, 2007). Este resultado se puede explicar debido a una baja concentración de la bacteria de cada suspensión de *P. salmonis* y que el método de centrifugación no es capaz de concentrar la totalidad de las bacterias, al menos para la cepa SLGO-95 y no a un comportamiento distinto de la cepa a los anticuerpos monoclonales del “kit” comercial. De acuerdo a lo anterior Silva (2007) estableció en ovas de salmón del Atlántico y de trucha arco iris susceptibles a la infección con dos cepas de *P. salmonis* (LF-89 y SLGO-95), que durante el proceso de centrifugación para la obtención de “muestra final”, se

¹ CI SLGO-95; suspensión bacteriana filtrada de botella de cultivo celular infectado con la cepa SLGO-95 de *P. salmonis*, usada durante el desafío de ovas de trucha arco iris.

pierden antígenos o estructuras bacterianas en fracciones de la primera (P1) y segunda centrifugación (S2) (Silva, 2007).

B.2. Cinética de infección de las ovas de trucha arco iris con *P. salmonis*

Los resultados obtenidos en la cinética de infección de las ovas de trucha arco iris (resultados C.3), demuestra que éstas son susceptibles a la infección de la cepa SLGO-95 de *P. salmonis*. La ausencia de positividad en la muestra de ova sin pre-tratamiento y solo desafiada con *P. salmonis* por 5 min, podría obedecer a la ausencia o baja cantidad de bacterias o estructuras bacterianas presentes en ella, ya sea por una menor concentración de la alícuota de la suspensión de desafío, lo que llevó a que la ova no pudo ser infectada o tal vez a la pérdida de antígenos o estructuras bacterianas en la obtención de la muestra final. Puesto que, en trabajos en paralelo mediante microscopía electrónica de barrido (MEB) se observó la infección de una ova de trucha arco iris desafiada con *P. salmonis* durante 5 min (cepa SLGO-95). Los resultados de esta observación con aumento 10.000x muestra bacterias adheridas en la superficie de la ova mediante sus prolongaciones llamadas CAP (Silva, 2007)

C.- Efecto de los tratamientos enzimáticos en la cinética de infección de *P. salmonis* sobre ovas de trucha arco iris (*O. mykiss*)

El presente trabajo corresponde al primer estudio de tratamiento de ovas de trucha arco iris con enzimas y la posterior infección con agentes patógenos sobre ella. Uno de los primeros antecedentes sobre solubilización de aislados de corion, corresponden a los otorgados por Cotelli *et al.* (1988), el cuál trabajo con corion de *Carassius auratus*, en el cuál determinaron que éstos pueden ser parcial o totalmente disueltos por enzimas, agentes denaturantes, reductores y no reductores. Además en ensayos con colagenasas se encontró que esta enzima digiere parcialmente preparaciones de corion frescos.

De acuerdo a investigaciones, la insolubilidad del corion de ovas de *O. mykiss* se logra después de la fecundación o de la activación de agua debido a la formación de isopeptidos de los residuos de sus cadenas proteicas de Gln (glutamina) y Lys (lisina) o Arg (arginina) (Papadopoulou *et al.*, 1996). Esta información apoyaría el uso de tripsina como pre-tratamiento con el fin de evaluar si se afectaría de algún modo la unión de la bacteria a la ova, considerando además la especificidad de esta enzima que actúa sólo en el lado carboxílico terminal de los residuos de lisina y arginina. Además su función permanece estable a distintas temperatura y un amplio rango de pH

Por otro lado, resultados obtenidos por Iwamatsu *et al.* (1995) en que observaron los cambios de aislados de corion de ovas no fertilizadas de *Orizyas latipes*, concuerdan con lo propuesto en esta memoria ya que la digestión proteolítica se logró usando distintas proteasas entre ellas tripsina. La digestión de los componentes proteicos mayores de peso molecular entre 77-73 KDa y de 49 Kda, y una proteína menor de 150 Kda (propia del corion no fertilizado) fueron digeridos usando tripsina, quimiotripsina, proteasas, termolisinas y pepsina. La digestión de las proteínas de 77-73 KDa logradas con tripsina, quimiotripsina y termolisina, produjeron proteínas de peso molecular intermedios que se encuentran en el proceso de endurecimiento del huevo, en el proceso de fertilización.

De los resultados obtenidos en la presente memoria, se observa que existe capacidad de infección de *P. salmonis*, posterior a la degradación parcial de la superficie de ovas de trucha arco iris con enzimas proteolíticas; y que ésta adhesión se ve afectada por el uso de enzimas, ya sea tripsina o proteinasa K. La disminución en la adhesión de la bacteria a la ova expresada como píxeles, nos demuestra que, efectivamente la unión de *P. salmonis* a ovas de trucha arco iris es mediada, al menos en parte por estructuras proteicas. Estos resultados nos indican que el cambio estructural del corion producido por las enzimas

proteolíticas, probablemente afectaría la unión de la bacteria a la ova y con ello su infección y posterior entrada (tabla 10, gráfico 4). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Li y Walker (1992) en que la unión de de *Rickettsia conorii* a la línea celular L-929 se ve disminuida, previa tripsinización de las células hospederas.

Los resultados obtenidos a los 5 y 10 minutos se desafío de ovas con la bacteria expresado como porcentaje de unión respecto a la carga inicial (Cl SLGO-95), se observa una tendencia a la disminución de la infección o adhesión de la bacteria a la ova, de la proteinasa K y de la tripsina; y de éstas respecto de los controles de infección. Ésta disminución se puede observar en el gráfico 3 y 4.

Los resultados obtenidos posteriores al uso de tripsina y proteinasa K sobre la ova, sugieren el rol que podrían tener las proteínas en el mecanismo de unión de las bacterias al corion. Se ha demostrado que, en el mecanismo de fijación bacterial de *R. conorii*, implica una proteína rickettsial y que las células del receptor objetivo también contienen una fracción proteica y que los componentes de la célula huésped (línea celular L-929 de fibroblastos de ratón) son susceptibles a la digestión por tripsina (Li y Walter., 1992).

Estudios más recientes realizados por Cossart *et al.* (2005), demostraron que la proteína Ku70 de la superficie de células huéspedes (células Vero y células HeLa) es crítica para que *R. conorii* entre en la célula, éste fue el primer receptor de rickettsia que se ha identificado. Este receptor es una sub unidad de un complejo proteico que se encuentra principalmente en el núcleo, pero también en el citoplasma de la célula y en la membrana celular del hospedero. Los resultados obtenidos en éste estudio indican que la rickettsia se une específicamente a Ku70, y que la unión y el reclutamiento de Ku70 a la superficie de la célula huésped son eventos importantes en la invasión de las células mamíferas que realiza *R. conorii*. Además, se encontró que esta proteína Ku70 interactúa con una proteína bacteriana; aunque el mecanismo que subyace a esta interacción sigue siendo poco clara. Esta unión entre proteínas es crítico en la entrada a la célula de la

bacteria, pero se desconoce si otra rickettsia y otros patógenos utilizan Ku70 como receptor.

En conclusión y de acuerdo a nuestros resultados, se puede establecer que la infección de las bacterias (cepa SLGO-95 de *P. salmonis*) a las ovas de trucha arco iris, se puede alterar por enzimas proteolíticas; con lo cuál se puede establecer y considerar que proteínas y/o polipéptidos participan en la unión y posterior internalización de la bacteria a la ova.

Considerando la importancia de la unión de la bacteria a células hospederas y su posterior propagación; este es un paso fundamental en la patogénesis de la infección. Su vulnerabilidad a la degradación de estructuras proteicas proporciona un lugar potencial para la prevención o inhibición en la propagación de la infección y la comprensión de la forma en la que esta bacteria interactúa con las células de su huésped podría llevar a nuevas estrategias profilácticas y/o terapéuticas.

Pruebas definitivas de este proceso a partir de estos microorganismos podrían ser proporcionadas por el aislamiento y la clonación del gen o genes específicos de *P. salmonis* que participaron en el proceso de internalización.

Esta memoria ofrece la oportunidad de seguir la investigación hacia la identificación del receptor de las células del hospedero.

CONCLUSIONES

- Las ovas de trucha arco iris (*O. mykiss*) son susceptibles a la infección por parte de cepa de *P. salmonis* (SLGO-95).
- El método dot-blot es capaz de detectar la presencia de *P. salmonis* en ovas de trucha arco iris.
- La estructura proteica del corion es afectada por la utilización de enzimas proteolíticas (tripsina y proteinasa K), y con ello se ve afectada la posterior unión de *P. salmonis* a la ova.
- En los mecanismos de unión entre ovas y *P. salmonis* participarían proteínas y/o polipéptidos.
- Tanto la proteólisis parcial (tripsina), como total (proteinasa K) disminuyeron la unión de *P. salmonis* a la ova.
- La metodología “dot blot” no permite comparar la eventual diferencia en la adhesión y/o penetración de la bacteria a la ova entre ovas tratadas con tripsina o proteinasa K.

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. 49:409-418.
- ALMENDRAS, F.; FUENTEALBA, L.; JONES, S.; MARKHAM, F.; SPANGLER, E.** 1997. Experimental infection and horizontal transmission of *Piscirickettsia salmonis* in freshwater-raised Atlantic salmon, *Salmo salar*. J. Fish Dis. 20: 409-418.
- ARRIAGADA, R.; JAMETT, A.; AGUAYO, J.; BECKER, M.I.** 1996. Aplicación de la citometría de flujo en el estudio de la sensibilidad a antibióticos *in vitro* de *Piscirickettsia salmonis*. In: XXXIX Reunión anual de la Sociedad de Biología de Chile. Viña del Mar, Chile. 8-10 octubre 1996.
- BARNES, M.N.; LANDOLT, M.L.; POWELL, D.B; WILTON, J. R.** 1998. Purification of *Piscirickettsia salmonis* and partial characterization of antigens. Dis. Aquat. Org 33: 33-41.
- BLANCO, M.C.** 1995. La trucha, cría industrial. Madrid. Ediciones Mundi-Prensa. 503 p.
- 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. 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.
- BRIVRIO MF.; BASSI R.; COTELLI F.** 1991. Identification and characterization of the major components of the *Oncorhynchus mykiss* egg chorion. Mol reprod Dev. 28: 85-93.
- CHEN, M.; YUN, S.; MERTY, G.; MACDOWELL, T.; HOUSE, M.; APPERSEN, J.; GUENTHER, T.; ARKUSH, K.; HEDRICK, R.** 2000. A *Piscirickettsia salmonis*-like bacterium associated with mortality of white seabass *Atractoscion nobilis*. Dis Aquat Org.43: 117- 126.

COTELLI, F.; ANDRONICO, F.; BRIVIO, M.; LORA, C. 1988. Structure and composition of the fish egg chorion (*Carassius auratus*). J. Ultrastruct. Mol. Struct Res. 99:70-78.

CONTRERAS, J. 1995. Infectividad de *P. salmonis* en salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) y trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*). Memoria de Título Méd. Vet. Santiago, Chile, Universidad de Chile, Fac. Cs. Vet. y Pec. 71 p.

COSSART, P.; MARTINEZ, J.; SEVEAU, S.; VEIGA, E. ; MATSUYAMA, S. 2005. Ku70, a Component of DNA-Dependent Protein Kinase, Is a Mammalian Receptor for Rickettsia conorii. *Cell*. 123:1013-1023.

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'postulate. J. Fish Dis. 14:121-145.

DIAZ, C., 1999. Comparación de las pruebas inmunodiagnósticas, inmunofluorescencia indirecta y ensayo-inmunoenzimático, para la detección de *P. salmonis*. Memoria de Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. 97 p.

FRYER, J.L.; LANNAN, C.N.; GARCÉS, H.L.; LARENAS, J.; SMITH, P.A. 1990. Isolation of rickettsia-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.

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

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. 18: 277-279.

GATICA, C. 2007. Cinética de la infección de *Piscirickettsia salmonis* en ovas de trucha arco iris (*O. mykiss*). Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. 54 p.

HA CH. Y IUCHI I. 1997. Extraction and partial characterization of egg envelope (chorion) transglutaminase of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: properties for efficient chorion hardening. Comp. Biochem. Physiol. 118: 293-301.

HAMODRAKAS S.; KAMITSOS E.; PAPADOPOULOU P. 1987 Laser-Raman and infrared spectroscopic studies of protein conformation in the eggshell of the fish *Salmo gairdneri*. Biochim. Biophys. Acta Abstract (913:163-9).

IUCHI, I.; MASUDA, K.; YAMAGAMI, K. 1991. Change in component proteins of the egg envelope (chorion) of rainbow trout during hardening. Develop. Growth & Differ 33 (1), 85-92 (1991).

IWAMATSU, T.; SHIBATA, Y.; KANIE T. 1995. Changes in chorion proteins induced by the exudate released from the egg cortex at the time of fertilization in the teleost, *Oryzias latipes*. Develop. Growth & Differ 37 (6), 747-759

KENT, M.L.; POPPE, T.T. 1998. Diseases of seawater netpenreared salmonids. Pacific Biological Station Press, Nanaimo, British Columbia, Canada, 138 pp.

KUZYK M.A., THORTON J.C., Kay W.W. 1996. Antigenic characterization of the salmonid pathogen *Piscirickettsia salmonis*. Infect Immun 64:5205-5210.

LAEMMLI, U.K. 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227:680-685.

LANNAN, C.N.; EWING, S.A.; FRYER, J.L. 1991. A fluorescent antibody test for detection of the rickettsia causing disease in Chilean salmonids. J. Aquat. Anim. Health 3:229-234.

LANNAN, C.N.; FRYER, J.L. 1994. Extracellular survival of *Piscirickettsia salmonis*. J. Fish Dis. 17:545-548.

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.; CONTRERAS, J.; OYANEDEL, S.; MORALES, M.A.; SMITH, P.A. 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.; ASTORGA, C.; CONTRERAS, J.; GARCÉS, H.; FRYER, J.L.; SMITH, P. 1996. Rapid detection of *Piscirickettsia salmonis* using microwave irradiation. Fish Pathol. 31(4):231-232.

LARENAS, J.; ASTORGA, C.; CONTRERAS, J.; SMITH, P. 1996. Detección de *Piscirickettsia salmonis* en ovos fertilizadas provenientes de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) experimentalmente infectadas. Arch. Med. Vet. 28: 161-166.

LARENAS, J.; TRONCOSO, O.; FERNÁNDEZ, S.; LEDEZMA, H.; SANDOVAL, N.; VERA, P.; CONTRERAS, J.; SMITH, P. 2002. Transmisión vertical experimental de *Piscirickettsia salmonis* y estudio de la forma de penetración a ovas de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) mediante microscopía electrónica de barrido.

LARENAS, 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 mole of entrance into the fish ovum. *Dis. Aquat. Org.* 56:25-30

Li, H. Y WALKER, D. 1992. Characterization of rickettsial attachment to host cells by low cytometry. *Infect. Immun.* 60(5): 2030–2035.

MAUEL, M.J.; GIOVANNONI, S.J.; FRYER, J.L. 1996. Development of polimerase chain reaction assays for detección, identificación and differentiation of *Piscirickettsia salmonis*. *Dis. Aquat. Org.* 26:189-195.

PAPADOPOULOU, P.; GALANOPOULOS V.K.; HAMODRAKAS S.J. 1996. Molecular and Supramolecular Architecture of the *Salmo gairdneri* Proteinaceous Eggshell during Development. *J. Struct. Biol.* 116(3):399-412

ROJAS, M.E. 2000. Comparación de la virulencia entre tres aislados de *Piscirickettsia salmonis* en trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*). Memoria de Título Médico Veterinario. Santiago, Chile, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. 93p.

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: *VIII International Conference Diseases of Fish and Shellfish*. Abstracts Book. Heriot-Watt University, Edinburgh, European Association of Fish Pathologists. pp. P-057.

SALMONCHILE INTESAL. Estadísticas: Exportación nacional y producción mundial de salmón y trucha cultivado. [en línea] <<http://estadisticas.intesal.cl/>> [consulta: 26 agosto 2008]

SIGMA-ALDRICH. Enzyme: Trysin and proteinase K. [en línea] <<http://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/enzyme-explorer/analytical-enzymes/trypsin.html>>, <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/enzyme-explorer/analytical-enzymes/proteinase-k.html> [consulta: 26 agosto 2008]

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 de Título Médico Veterinario. Santiago, Chile, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. 95p.

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. 1996. Experimental challenge of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with *Piscirickettsia salmonis*. J. Aquat. Anim. Health 8:130-134.

SMITH, PA.; VECCHIOLA, I.M.; OYANEDEL, S; GARCÉS, L.H.; LARENAS, J.; CONTRERAS, J. 1996b. Antimicrobial sensitivity of four isolates of *Piscirickettsia salmonis*. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 16:164-168.

SMITH, P.A.; CONTRERAS, J.R.; LARENAS, J.J.; AGUILLON, J.C.; GARCES, L.H.; PEREZ, B.; FRYER, J.L. 1997. Immunization with bacterial antigens: piscirickettsiosis. Dev. Biol. Stand. 90:161-6.

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.

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.

VENEGAS, C. 1996. *Piscirickettsia salmonis*: Prospección en fauna marina asociada a cultivos de salmónidos infectados. Periodo Invierno-primavera. Memoria de Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. Universidad de Chile. Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. 95 p.

ZAMORANO, E. 2003. Cinética de la infección de ovarios de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) por *Piscirickettsia salmonis* evaluada mediante inmunohistoquímica. Memoria de Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. Universidad de Chile. Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias 91 p.

ANEXO 1

A.- HOMOGENEIZADO DE OVAS

Cada ova descongelada se colocó en un tubo de centrifugación y se le adicionó 1 mL de una solución de homogeneizado, la que contenía Buffer de Homogeneización (1 mL) e inhibidores de proteasas. En detalle se muestra como se preparó 10 mL de solución de homogeneizado en el siguiente cuadro:

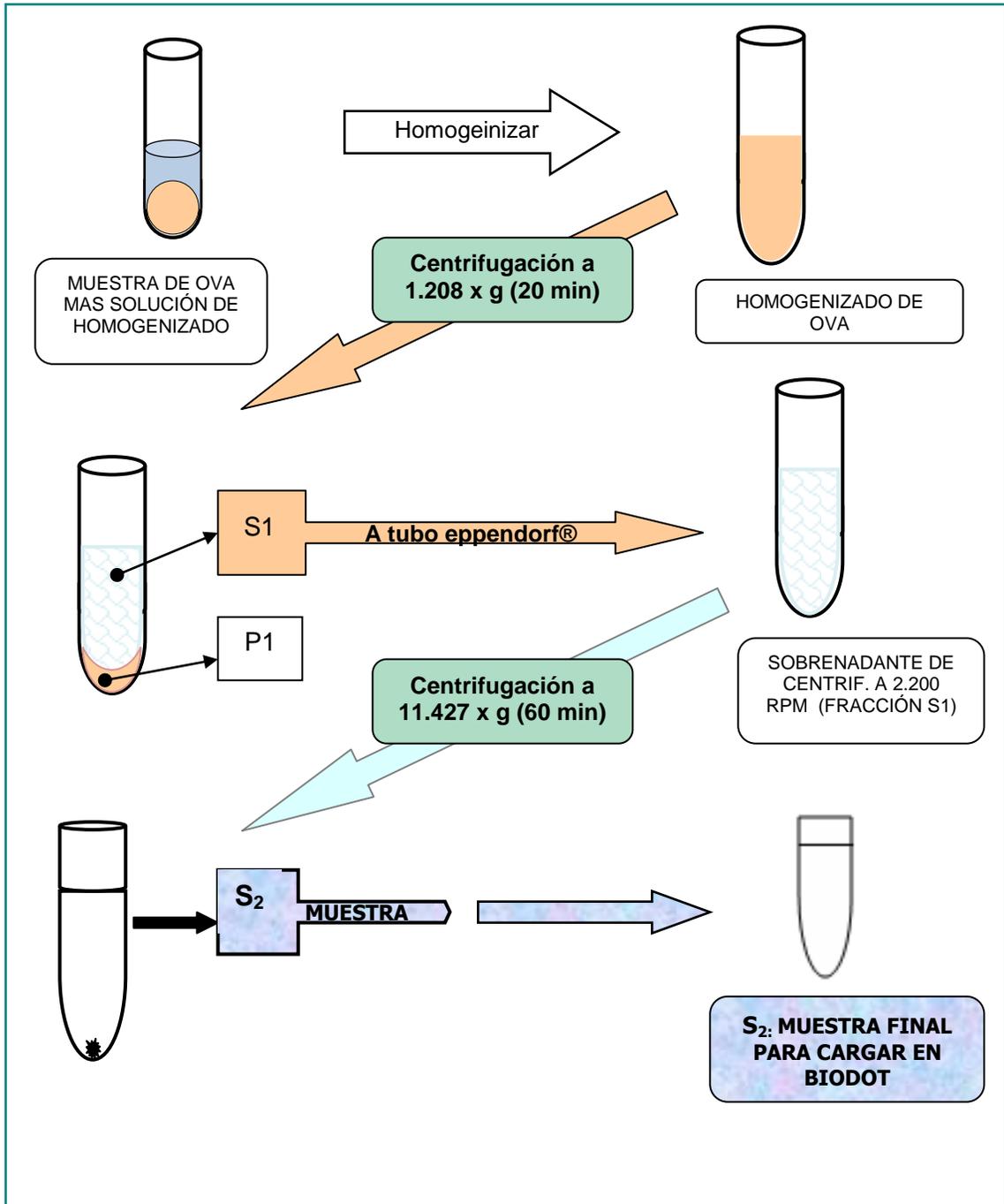
	Proporción	Volúmenes
Buffer de homogeneización	1/1	10 mL
Pepstation 2 mM	1 µL/mL	10 µL
Leupeptin 1 mM	1 µL/mL	10 µL
Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1 mM	4 µL/20 mL	2 µL

Posterior a esto se homogeneizaron mediante el uso de un Ultraturrex a 13.000 r.p.m. durante 15 segundos, donde para cada ova el procedimiento se repitió 3 veces con pausas de 15 segundos en frío (tubo posado en un vaso con hielo).

B.- CENTRTIFUGADO DE MUESTRAS

Luego del proceso de homogeneizado se colocó los tubos que contenían las muestras dentro de la centrifuga para ser centrifugados a 2.500 rpm (1.208 x g) durante 20 minutos a una temperatura de 4° C. Producto de este centrifugado se obtuvo tres fracciones dentro de cada tubo, la primera y más superficial correspondiente a estructuras de bajo peso molecular, una segunda y central (S1) correspondiente a una solución sobrenadante, y una tercera o “pellet” (P1) correspondiente a estructuras que precipitaron producto de esta centrifugación. Para la segunda centrifugación se usó la fracción del centro, la cuál se extrajo mediante el uso de micro pipeta una cantidad de 800 µL y se traspasó a un tubo eppendorf debidamente rotulado. Estos tubos eppendorf se colocaron en el rotor 3326 de la misma centrifuga usada en la primera centrifugación. En esta

oportunidad las muestras se centrifugaron a 11.000 rpm (11.427 x g) durante 60 minutos a 4° C. Producto de esta centrifugación se generó una fracción, correspondiente al sobrenadante (S2), la cual correspondió a la muestra definitiva o muestra final.



Esquema del proceso de homogenizado y centrifugado de ovas desafiadas con las cepas SLGO-95 y LF-89 de *Piscirickettsia salmonis*. Obtención de muestra final para usar en "dot-blot".

C.- METODOLOGÍA “DOT-BLOT”

PROTOCOLO

Primer día

1. Colocar la membrana PVDF en metanol por 15 s, luego 2 min en agua destilada y por último 10 min en TBS 1x tween 20 en un recipiente plástico sobre un agitador y posteriormente instalarla en el BioDot. Este procedimiento torna a la membrana de hidrofóbica a hidrofílica, permitiendo que las muestras puedan atravesarla.
2. Activar la bomba de vacío y luego cargar las muestras con micropipeta en el BioDot.
3. Lavar la membrana en TBS 1X Tween 20 por 20 min.
4. Bloquear las zonas de la membrana PVDF que no retuvieron proteínas colocando esta membrana en un recipiente plástico con una solución de leche descremada al 6% en TBS 1X Tween 20 hasta el siguiente día.

Segundo día

- Lavar la membrana con TBS 1X Tween 20 por 10 min en un agitador, en 3 oportunidades.
- Incubar membrana con una solución oligoclonal de anticuerpos correspondiente a una inmunoglobulina (Ig) G de ratón anti-*P. salmonis* (Kit SRS Fluorotest Indirecto, BiosChile) por 2 h, en dilución 1:5.000.
- Lavar la membrana con TBS 1X Tween 20 por 10 min en un agitador, en 3 oportunidades.
- Incubar con un segundo anticuerpo anti IgG de ratón elaborado en cabra, conjugado a una peroxidasa (ImmunoPure® Antibody Horseradish Peroxidase, Pierce) por 1 h en dilución 1:10.000.
- Lavar la membrana con TBS 1X Tween 20 por 10 min en un agitador, en 3 oportunidades.

- Colocar la membrana en contacto con el sustrato que reacciona con la peroxidasa del segundo anticuerpo (Super Signal®, Chemiluminiscent Horseradish Peroxidase, Pierce®) en una capa fina por un tiempo de 5 a 10 min.
- Poner la membrana en contacto con una película autoradiográfica (Kodac BioMax MR-1 Film 8x10 in, Sigma) dentro de un casete de exposición (Exposure casete, vinyl-covered with Velcro® closure for 8x10 in film, Sigma-Aldrich) por 2 a 8 min.
- Revelar la película.

Evaluar mediante densitometría usando software computacional (Un-Scan-It Versión 4.1, 1996).

ANEXO 2

A.- BUFFER DE MUESTRA 4X.

	Volúmenes
SDS	5 mL
Glicerol	2 mL
β mercapto etanol	100 µL
Tris HCl 0.5 M pH 6,8	1 mL
Azul bromofenol 0.5%	1 mL