



**UNIVERSIDAD DE CHILE**

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



COMPARACIÓN DE LA CINÉTICA DE INFECCIÓN CON  
*Piscirickettsia salmonis* ENTRE OVAS DE SALMÓN DEL  
ATLÁNTICO (*Salmo salar*) Y TRUCHA ARCO IRIS  
(*Oncorhynchus mykiss*)

**PABLO ANDRÉS SILVA LANDEROS**

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

**PROFESOR GUÍA: JULIO LARENAS HERRERA**

SANTIAGO – CHILE  
2007



**UNIVERSIDAD DE CHILE**

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



COMPARACIÓN DE LA CINÉTICA DE INFECCIÓN CON  
*Piscirickettsia salmonis* ENTRE OVAS DE SALMÓN DEL  
ATLÁNTICO (*Salmo salar*) Y TRUCHA ARCO IRIS  
(*Oncorhynchus mykiss*)

**PABLO ANDRÉS SILVA LANDEROS**

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

NOTA FINAL:.....

|   | NOTA  | FIRMA |
|---|-------|-------|
| PROFESOR GUÍA : JULIO LARENAS H. ....           | ..... | ..... |
| PROFESOR CONSEJERO : MARCO GALLEGUILLOS C. .... | ..... | ..... |
| PROFESOR CONSEJERO : PEDRO SMITH Sch. ....      | ..... | ..... |

**SANTIAGO – CHILE**  
**2007**

*Dedico esta memoria de título a mi familia, padres y hermano,  
que me han acompañado y apoyado a lo largo de todos mis desafíos.*

## **AGRADECIMIENTOS**

El desarrollo de este trabajo se realizó en las unidades de Anatomía Patológica y de Patología de Organismos Acuáticos del Departamento de Patología Animal y en el Laboratorio de Bioquímica y Química del Departamento de Ciencias Biológicas Animales, ambos de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile. Deseo agradecer la ayuda y el tiempo entregado por el Dr. Julio Larenas, quien me recibió con mucha disposición para trabajar como tesista en su proyecto de investigación, a parte de su interés por conseguirnos cupos en seminarios y prácticas profesionales. No puedo obviar gratitud a los Doctores Marco Galleguillos y Héctor Adarmes por guiar y aconsejarme durante todo el transcurso de mi trabajo, en el cuál tuvieron gran participación, y al Dr. Pedro Smith por su gran disposición para atender mis solicitudes. También quiero agradecer a mis compañeros de tesis paralelas Natalia Toledo, Jacqueline Quinteros, Carlos Gatica y Catalina Bravo, con los cuáles trabajamos y compartimos experiencias de utilidad mutua, y el trabajo desarrollado en los laboratorios por Verónica Vera y Víctor Molina que permitieron realizar mis experimentaciones.

Claramente no puedo mencionar a todas las personas que quisiera, pero si quiero dejar en claro que cada una de las personas que pasaron por mi vida en el pregrado de mi carrera universitaria, profesores, compañeros, funcionarios y amigos, además de actividades en las que participé y organicé, Trabajos Voluntarios Veterinarios, selección de Fútbol y el Portal Ocupacional Veterinario, formaran parte de mi vida futura en base a recuerdos, experiencias y conocimientos que me permitirán ser un profesional que dejará en alto el nombre de mi Universidad y Facultad.

Por último quiero agradecer profundamente a mis padres, Alicia Landeros y Carlos Silva, por la formación base, apoyo y cariño incondicional que me han dado, a mi hermano Carlos por su compañía y confianza durante toda su vida, y a mi pareja Claudia Pacheco por compartir parte de su vida conmigo durante estos increíbles años.

## RESUMEN

Hasta la fecha, se han realizado múltiples estudios sobre la transmisión vertical de *Piscirickettsia salmonis*. Al respecto, se ha demostrado que la bacteria puede infectar ovas durante el proceso de fertilización y que es capaz de adherirse a la superficie coriónica mediante unas estructuras denominadas complejo de adhesión piscirickettsial o CAP. Estos estudios sólo han sido realizados en ovas de la especie trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) utilizando la cepa de referencia LF-89. En la presente memoria, se buscó comparar la infección de dos cepas de esta bacteria (LF-89 y SLGO-95) sobre ovas de salmón del Atlántico (*Salmo salar*) y trucha arco iris.

Los experimentos consistieron en el desafío de ovas de las dos especies salmonídeas, con dos suspensiones bacterianas de *P. salmonis* (cepas LF-89 y SLGO-95) durante distintos tiempos (1, 3, 5, 10, 30 y 60 min) para obtener una cinética de infección. Las muestras de estas ovas fueron sometidas a una técnica “dot-blot” para la detección de *P. salmonis*, y los resultados fueron analizados densitométricamente mediante un “software” computacional. Además, mediante una técnica de microscopía electrónica de barrido (MEB) se observó la superficie coriónica de ovas de salmón de Atlántico y trucha arco iris con el fin de detectar si la bacteria se unía mediante el CAP.

Mediante la técnica de “dot-blot” se estableció que las ovas de salmón del Atlántico son sensibles a la infección con cualquiera de las dos cepas de *P. salmonis* usadas (SLGO-95 y LF-89), mientras que las ovas de trucha arco iris sólo presentaron positividad a la infección con la cepa SLGO-95. En el caso de la especie salmón del Atlántico se detectó positividad al “dot-blot” en muestras provenientes de ovas desafiadas durante dos tiempos (10 y 60 min) con la cepa SLGO-95 y tres tiempos (5, 10 y 60 min) con la cepa LF-89. Para ovas de trucha arco iris desafiadas con la cepa SLGO-95 se detectó positividad a la infección en cuatro tiempos de desafío (1, 3, 10 y 60 min) bacteria-ova. Mediante el uso de MEB se observó la presencia de CAP sobre la superficie de ovas de salmón del Atlántico y trucha arco iris desafiadas 5 min a ambas cepas de *P. salmonis*.

Los resultados de “dot-blot” y MEB permiten concluir que ambas cepas se unen e infectan a las ovas de salmón del Atlántico, lo cual es el primer indicio de una posible

infección vertical en dicha especie. Por otra parte, el método “dot-blot” no permitió comparar la cinética de infección entre ovas y cepas de bacterias, por lo que sólo se pudo utilizar como una técnica cualitativa para la detección de *P. salmonis*.

## INDICE

|  |           |
|--|-----------|
| <b>INTRODUCCIÓN</b> .....  | <b>1</b>  |
| <b>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b> .....  | <b>3</b>  |
| A- Agente causal.....  | 4         |
| B- Epidemiología.....  | 5         |
| C- Serología, signología y lesiones .....  | 8         |
| D- Necropsia e histopatología .....  | 8         |
| E- Diagnósis.....  | 9         |
| F- Vías de transmisión .....   | 10        |
| G- Prevención y tratamiento.....   | 12        |
| <b>OBJETIVO GENERAL</b> .....  | <b>15</b> |
| <b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....   | <b>15</b> |
| <b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....  | <b>16</b> |
| A- Cinética de infección en ovas de salmón del Atlántico y trucha arco iris con dos cepas de <i>Piscirickettsia salmonis</i> .....   | 16        |
| A.1- Ovas.....   | 16        |
| A.2- Bacteria.....   | 16        |
| A.3- Desafío de ovas con las cepas SLGO-95 y LF-89 de <i>P. salmonis</i> .....   | 17        |
| A.4- Preparación de la muestra para el “dot-blot” .....  | 18        |
| A.5- Metodología “dot-blot” .....  | 19        |
| A.6- Determinación, mediante la metodología “dot-blot”, de la cinética de infección de <i>P. salmonis</i> en ovas de dos especies salmonídeas desafiadas con las cepas SLGO-95 y LF-89. .... | 20        |
| A.6.1- Primera experiencia .....   | 21        |
| A.6.2- Segunda experiencia .....   | 22        |
| A.6.3- Tercera experiencia .....   | 24        |
| B- Observación mediante microscopía electrónica de barrido (MEB) de la infección de ovas de salmón del Atlántico y trucha arco iris con dos cepas de <i>P. salmonis</i> .....                | 25        |
| B.1- Procesamiento y observación de muestras para MEB.....   | 25        |
| C.- Análisis de resultados .....   | 26        |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>RESULTADOS</b> .....   | <b>27</b> |
| A.- Determinación, mediante la metodología “dot-blot”, de la cinética de infección de <i>Piscirickettsia salmonis</i> en ovas de dos especies salmonídeas desafiadas con las cepas SLGO-95 y LF-89..... | 27        |
| A.1- Primera experiencia .....  | 27        |
| A.1.1- Controles positivos .....  | 27        |
| A.1.2- Controles negativos .....  | 31        |
| A.1.3- Cinética de infección de <i>P. salmonis</i> cepa SLGO-95 en ovas de salmón del Atlántico .....   | 31        |
| A.2- Segunda experiencia.....   | 32        |
| A.2.1- Controles positivos .....  | 32        |
| A.2.2- Controles negativos .....  | 37        |
| A.2.3- Cinética de infección de dos cepas de <i>P. salmonis</i> en ovas de salmón del Atlántico .....   | 38        |
| A.3- Tercera experiencia .....  | 44        |
| A.3.1- Controles positivos .....  | 44        |
| A.3.2- Controles negativos .....  | 46        |
| A.3.3- Cinética de infección de dos cepas <i>P. salmonis</i> en ovas de trucha arco iris .....  | 46        |
| A.4- Comparación de las cinéticas de infección con <i>P. salmonis</i> de ovas de salmón del Atlántico y trucha arco iris .....  | 49        |
| A.5- Síntesis de resultados obtenidos mediante la metodología “dot-blot” .....  | 49        |
| A.5.1- Resultados de positividad a la metodología “dot-blot” de muestras provenientes de las cepas usadas en los desafíos de ovas de salmónidos (controles positivos) .....                             | 49        |
| A.5.2- Resultados de positividad a la metodología “dot-blot” de las muestras provenientes de ovas de salmón del Atlántico desafiadas con las cepas SLGO-95 y LF-89.....                                 | 51        |
| A.5.3- Resultados de positividad a la metodología “dot-blot” de las muestras provenientes de ovas de trucha arco iris desafiadas con las cepas SLGO-95 y LF-89.....                                     | 52        |
| B- Observación mediante microscopía electrónica de barrido (MEB) de la infección de ovas de salmón del Atlántico y trucha arco iris con dos cepas de <i>P. salmonis</i> .....                           | 55        |
| <b>DISCUSIÓN</b> .....  | <b>57</b> |
| <b>CONCLUSIONES</b> .....   | <b>66</b> |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>NOMENCLATURA</b> .....   | <b>67</b> |
| A.- Nomenclatura para muestras usadas durante la primera experiencia .....                                  | 67        |
| B.- Nomenclatura para muestras usadas en la segunda y tercera experiencias .                                | 68        |
| <b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....   | <b>73</b> |
| <b>ANEXO 1</b> .....  | <b>78</b> |
| A.- Homogeneizado de ovas.....  | 78        |
| B.- Obtención de muestra final para uso en “dot-blot” .....   | 78        |
| C.- Metodología “dot-blot”.....   | 79        |
| <b>ANEXO 2</b> .....  | <b>81</b> |
| A.- Cantidad de proteína total en muestras usadas y respectivos resultados en experiencias “dot-blot” ..... | 81        |
| A.1- Proteína total de muestras de la primera experiencia y sus resultados al “dot-blot” .....              | 81        |
| A.2- Proteína total de muestras de la segunda experiencia y sus resultados al “dot-blot” .....              | 82        |
| A.3- Proteína total de muestras de la tercera experiencia y sus resultados al “dot-blot” .....              | 83        |

## INTRODUCCIÓN

La producción durante la etapa de desarrollo de salmones en agua de mar, en muchos planteles del sur chileno, se ha visto afectada por una enfermedad septicémica provocada por la bacteria *Piscirickettsia salmonis*. Tal enfermedad se ha observado desde 1989, fecha donde su agente causal era desconocido, y generó mortalidades principalmente en otoño y primavera del orden de 20 a 50%. En ese año, la enfermedad tuvo carácter de epizootia afectando cultivos de Puerto Montt, Chiloé insular y continental, alcanzando mortalidades de hasta un 70% y en un caso particular con pérdida total de la población. Hoy en día se sabe que la enfermedad afecta a todas las especies salmonídeas cultivadas en Chile.

En mayo de 1989, Bravo y Campos detectaron el agente causal de la actualmente llamada piscirickettsiosis, el cual por su pequeño tamaño (2  $\mu\text{m}$  aprox.) y por la dificultad de teñirse con las tinciones comúnmente usadas, siempre había pasado inadvertido. Esta enfermedad pudo haber sido enmascarada por otras alteraciones, tales como la enfermedad bacteriana del riñón o “bacterial kidney disease” (BKD), problemas nutricionales, tóxicos, manejo y estrés. Inicialmente, debido a las características morfológicas y de comportamiento dentro del hospedero se determinó que la bacteria podría corresponder a una rickettsia. En 1992, Fryer *et al.* mediante el análisis de 16S rRNA, establecieron que la cepa tipo (LF-89) es una gammaproteobacteria. En la misma publicación, un nuevo género y especie (*Piscirickettsia salmonis* gen. nov., esp. nov.) es propuesto para este microorganismo.

Los salmónidos afectados se aprecian lentos e inapetentes, ubicándose preferencialmente en las esquinas de las balsas-jaula, presentan coloración corporal oscura y acentuada palidez branquial, lo que refleja una anemia severa.

En diversos estudios experimentales se ha demostrado la transmisión horizontal de *P. salmonis* tanto en agua dulce como salada, a pesar de que *in vitro* la bacteria presenta una baja viabilidad en agua dulce. Con respecto a la transmisión vertical, experimentalmente se ha demostrado la presencia del microorganismo en trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) en las etapas denominadas estado de ojo, alevines de saco y en

peces de 1g, resultantes de la infección de reproductores machos y/o hembras. Además, se ha establecido la infección de la ova durante el proceso de fecundación.

Los trabajos experimentales de transmisión vertical de *P. salmonis* publicados hasta la fecha solo han demostrado la infección de ovas en trucha arco iris (*O. mykiss*) y específicamente con la cepa LF-89. No se conoce si otras cepas de *P. salmonis* pueden infectar las ovas durante la fecundación y si este proceso se puede presentar en otras especies salmonídeas. Por lo anterior, en la presente memoria se pretendió establecer si las cepas LF-89 y SLGO-95 son capaces de infectar *in vitro* ovas de salmón del Atlántico (*Salmo salar*) y si existen diferencias respecto a la misma infección en ovas de trucha arco iris (*O. mykiss*).

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

El primer reporte de la presencia de un microorganismo tipo rickettsia en peces fue descrito en Egipto el año 1939. Ese año, a partir de la observación de un pez erizo enfermo, especie *Tetraodon fahaka*, se observó dentro de monocitos y en el plasma, pequeñas formas cocoides eosinofílicas a la tinción Giemsa (Fryer y Mauel, 1997). Por otro lado, el primer aislado en peces de un posible agente rickettsial fue obtenido desde truchas arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) en Alemania (Özel y Schwanz-Pfitzner, 1975), sin embargo, este microorganismo no se preservó para futuros estudios. Otro reporte relacionado al hallazgo de microorganismos similares, se produjo en las costas de Gales, Gran Bretaña. En este caso el organismo tipo rickettsia se encontró en varios especímenes de primillas o “Dragonets” maduros, especie *Callionymus lyra*, de forma casual durante un estudio que buscaba la presencia del parásito sanguíneo *Haemogregarina quadrigemina*.

Desde que *Piscirickettsia salmonis* fue caracterizado, muchos agentes similares morfológicamente han sido detectados en peces salmonídeos alrededor del mundo. Uno de estos organismos fue identificado, en 1991, en salmones del Atlántico (*Salmo salar*) enfermos recolectados desde cultivos en agua marina Canadiense. En 1992, otro organismo similar a *P. salmonis*, fue detectado en Noruega en cortes histológicos de hígado de salmones de Atlántico que presentaban una enfermedad llamada hepatitis necrotizante. Un organismo de este tipo fue también observado en microscopía electrónica de tejidos de salmones del Atlántico cultivados en Irlanda. En 1994 otro organismo morfológicamente similar se asoció a nados anormales en peces juveniles de róbalo o “sea bass” (*Dicentrarchus labrax*) en Francia (Comps *et al.*, 1996). Todos estos organismos producen una patología similar a la asociada con piscirickettsiosis en salmónidos chilenos, pero la relación precisa entre ellos y *P. salmonis* no ha sido determinada (Fryer y Lannan, 1994).

En el sur de Chile, durante el período de cosecha 89/90 en muchas empresas hubo altas mortalidades de salmones coho (*Oncorhynchus kisutch*) cultivados en balsas jaula. El agente causal detectado tenía un tamaño de aproximado de 2  $\mu\text{m}$ , se teñía débilmente gramnegativo, era claramente visible teñido con Giemsa, y fue detectado en gran número en sangre, riñón, bazo, hígado y branquias de peces afectados (Bravo y Campos, 1989).

## A- Agente causal

El agente causal, fue identificado por Fryer *et al.* (1990) y Cvitanich *et al.* (1991) a partir de salmones coho (*O. kisutch*) enfermos provenientes de Chiloé, Chile. La bacteria crece en cultivos celulares de especies salmonídeas sin antibiótico, luego de 10 días de incubación a 15° C, produciendo un efecto citopático (ECP), que se evidencia como grupos de células redondeadas. Además se determinó que la temperatura óptima para el cultivo *in vitro* es entre 15 y 18° C (Fryer *et al.*, 1990). Fryer *et al.* (1990); 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.

El agente causal se observó en frotis preparados de tejidos de salmones coho (*O. kisutch*) naturalmente infectados, de riñón, bazo, hígado, músculo, piel, corazón, sangre, cerebro, ovarios, fluido ovárico, testículos, intestino, grasa visceral y branquias. Además fue ocasionalmente observado en infecciones mixtas, mas a menudo con un microsporidio o *Renibacterium salmoninarum*, agente causal de la enfermedad bacteriana renal (BKD, “bacterial kidney disease”) (Cvitanich *et al.*, 1991).

Este microorganismo inicialmente se conoció como agente no identificado o UA (por su acrónimo en inglés de “unknown agent”). Fryer *et al.* (1990) lograron establecer que correspondía a una bacteria intracelular obligada, que fue denominada cepa LF-89. El análisis del 16S rRNA de la cepa indicó que correspondía a una Gammaproteobacteria distantemente relacionada a *Coxiella burnetti* y quizás a *Wolbachia persica*. Un nuevo género y especie (*Piscirickettsia salmonis* gen. nov., esp. nov.) fue propuesto para este microorganismo (Fryer *et al.*, 1992), lo cual determinó el nombre oficial para esta enfermedad: piscirickettsiosis.

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 a 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).

El agente es una bacteria gramnegativa, inmóvil, acapsulada, intracelular obligada, Giemsa positiva, pleomórfica, cocoide formando anillos y frecuentemente unidos en pares; de tamaño variable entre 0,5 y 1,5  $\mu\text{m}$ . A la microscopía se observó como inclusiones citoplasmáticas en las células infectadas y rodeado por dos capas de membranas, una ondulada externa y una citoplasmática interna. Estos microorganismos, aparentemente, se encontraban frecuentemente bajo fisión binaria (Fryer *et al.*, 1990). Con respecto al tamaño, Quinteros (2005) realizó mediciones de *P. salmonis* mediante la observación por microscopía electrónica de barrido (MEB) donde observaron tamaños bacterianos que fluctuaron entre 0,2 y 1,5  $\mu\text{m}$ .

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

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

Con respecto a la antigenicidad de la bacteria, Kuzyk *et al.* (1996) señalan seis antígenos principales, moléculas de 11, 16, 65, 60, 54 y 51 kDa. Últimamente, Barnes *et al.* (1998) han tenido resultados diferentes, ya que señalan ocho proteínas antigénicas probablemente propias de *P. salmonis* (108, 95, 60, 56, 40, 36, 32 y 20 kDa).

## **B- Epidemiología**

La enfermedad producida por *P. salmonis* se presentó por primera vez en la zona del canal Huito y se extendió posteriormente al canal Caicaén, ambas de la comuna de Calbuco, provincia de Llanquihue, décima región. Luego de esto se extendió, con pocas excepciones, a la totalidad de los centros de cultivo del salmón coho (*O. kisutch*) de la

misma región. Hasta esos momentos, la enfermedad no fue diagnosticada en la XI y XII regiones. En general, las mortalidades se presentan una vez transcurridas 6 a 12 semanas de haber ingresado los “smolt” al mar, con porcentajes variables entre el 3 al 7% semanal. En casos particulares, la mortalidad acumulada al periodo de cosecha ascendió al 60-80% del total de la población (Alvarado *et al.*, 1990). La enfermedad que produjo estas altas mortalidades se ha denominado de diversas formas, tales como “síndrome de Huito”, “síndrome del salmón coho” (Bravo y Campos, 1989), “síndrome rickettsial salmonídeo” (SRS) (Cvitanich *et al.*, 1991) y últimamente como “piscirickettsiosis” (Fryer *et al.*, 1992).

Bravo y Campos (1989) señalan que el agente etiológico de la piscirickettsiosis estaba presente desde 1981 en salmones cultivados por primera vez en balsas jaula. Sin embargo, sólo a partir de 1989 se han producido mortalidades de tipo crónica y estacional (otoño y primavera principalmente), del orden del 20 a 50% de incidencia. Hasta esta observación, los síntomas provocados por este microorganismo probablemente estuvieron enmascarados por agentes etiológicos relacionados con BKD, problemas nutricionales, tóxicos, manejos y estrés, entre otros. Los primeros brotes se relacionaron a un periodo posterior a fluctuaciones en la temperatura del agua, presencia de un “bloom” de algas no tóxicas y/o estrés relacionado a severas tormentas (Branson y Nieto Díaz-Muñoz, 1991). Graumann *et al.* (1997), han propuesto recientemente que el proceso de esmoltificación puede incrementar la susceptibilidad de los salmones infectados.

Bravo y Campos (1989) suponían que *P. salmonis* era específica, ya que sólo afectaba al salmón coho (*O. kisutch*), y no a la trucha arco iris (*O. mykiss*) ni el salmón del Atlántico (*Salmo salar*). A comienzos de 1990, la enfermedad fue reportada por primera vez en salmón del Atlántico (*S. salar*) y posteriormente en trucha arco iris (*O. mykiss*) y en salmón chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*) (Alvarado *et al.*, 1990). La especie más susceptible a presentar piscirickettsiosis sería el salmón coho (*O. kisutch*) (Smith *et al.*, 1996a). Por otra parte, un organismo con características antigénicas y patogénicas similares a *P. salmonis*, aislado en el este de Canadá, se inoculó IP en distintas especies de salmónidos y se observó susceptibilidades distintas a las observadas en el caso de *P. salmonis*. En este caso la especie más susceptible fue salmón del Atlántico (*S. salar*) (Jones *et al.*, 1998).

En Chile, dada la aparente especificidad de la infección frente al salmón coho (*O. kisutch*), se comenzó a disminuir la producción de esta especie favoreciendo el aumento del número y densidad en la producción de salmón del Atlántico (*S. salar*) y trucha arco iris (*O. mykiss*), lo que evidenció la susceptibilidad a piscirickettsiosis en estas dos especies (Alvarado *et al.*, 1990). Con respecto a esto último, se han orientado manejos tendientes a disminuir la densidad animal en las balsas jaula como medida de control. Al respecto 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 (*O. mykiss*) 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/m<sup>3</sup>. 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/m<sup>3</sup>. Esto último demuestra un efecto de sinergismo entre la temperatura de 14° C y la densidad poblacional de 20 k/m<sup>3</sup> para desarrollar la enfermedad.

La presentación del cuadro se concentra principalmente entre otoño y primavera (Bravo y Campos, 1989). La enfermedad ha sido descrita principalmente en salmones que son criados en agua marina y de estuario (Bravo y Campos, 1989; Fryer *et al.*, 1990). Sin embargo esto último existen reportes de piscirickettsiosis en salmones criados en agua dulce (Bravo 1994). En Diciembre de 1993 ocurrió un brote de piscirickettsiosis entre un grupo de truchas arco iris (*O. mykiss*) criadas en el Lago Llanquihue, décima región, Chile. Los peces infectados en este brote fueron importados a Chile como ovas desde los Estados Unidos. Además, otro grupo de peces de la misma especie, criados en el mismo lugar pero provenientes de reproductores chilenos que ya sobrevivieron a la enfermedad durante la fase marina, no presentaron la enfermedad ni fueron positivos a la detección de *P. salmonis* por inmunofluorescencia (Bravo, 1994). En Septiembre de 1993, se aisló *P. salmonis* a partir de tejido renal de salmones coho (*O. kisutch*) y truchas arco iris (*O. mykiss*) enfermos. Estos salmones pertenecían a varios centros de agua dulce localizados en la isla de Chiloé, décima región, Chile.

Importaciones anuales de ovas a Chile desde regiones criadoras de salmonídeos del hemisferio norte proveen un suministro de peces para cultivo, pero cada cuál puede haber

limitado la resistencia natural a este patógeno único, hasta ese entonces, en agua chilenas. Las epizootias de piscirickettsiosis demostraron ampliamente una desafortunada consecuencia de la interacción de especies nativas con especies introducidas para la acuicultura (Fryer y Lannan, 1993).

### **C- Serología, signología y lesiones**

Los salmones afectados presentan niveles en su hematocrito que revelan una severa anemia (Bravo y Campos, 1989). El hematocrito de peces moribundos promedia dentro de un rango de 4 a 34%, evidenciándose además, un gran número de macrófagos en la sangre periférica. Los eritrocitos observados eran típicamente normocítico-normocrómico (Cvitanich *et al.*, 1990). En la generalidad, los signos clínicos observados son: nado superficial, lento y errático. También se describe letargia, anorexia, choques contra las paredes de las balsas jaula, orillamiento y oscurecimiento (Larenas *et al.*, 1995). La primera evidencia de esta enfermedad presente en las primeras muestras tuvo la apariencia de pequeñas manchas blancas sobre el pez. Algunos peces afectados muestran lesiones de piel similares, enmarcadas desde pequeñas áreas de levantamientos, a menudo hemorrágicas, de 0,5 cm de diámetro o menos, a través de placas levantadas 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, 1990).

### **D- Necropsia e histopatología**

Al análisis de necropsia, es común encontrar ascitis, reno y esplenomegalia, nodulaciones capsulares de color cremoso a amarillento en hígado, presencia de una pseudomembrana envolviendo a corazón y hemorragias petequiales en estómago, ciegos pilóricos, intestino, vejiga natatoria, muscular y grasa visceral. En la gran mayoría de los casos el intestino se encontró lleno con un contenido mucoso amarillento y el estómago con un líquido transparente seromucoso (Schäfer *et al.*, 1990). Los estudios de histopatología demuestran que las principales lesiones corresponden a necrosis en diversos órganos y tejidos, siendo los mayormente afectados el riñón, hígado, bazo e intestino. También relevante es la proliferación de tejido conectivo y alteraciones vasculares (Larenas *et al.*, 1995).

Con respecto a la necrosis renal, se observa necrosis de glomérulo y las células más afectadas corresponden a los endotelios y podocitos. Además es posible encontrar

necrosis de túbulos renales sobre todo en peces moribundos. Por otra parte, según evidencias experimentales, la necrosis endotelial de los vasos sanguíneos del hígado sería una lesión que correspondería a los inicios de la diseminación de *P. salmonis*. La necrosis de bazo se presenta más severa en peces moribundos (Larenas *et al.*, 1995).

### **E- Diagnosis**

En terreno, la piscirickettsiosis es presuntamente diagnosticada en base a los signos clínicos descritos (Kent y Poppe, 1998). El agente etiológico, se puede detectar mediante el uso de tinciones, de frotis de tejido, con Giemsa, hematoxilina-eosina (HE), Gram, naranja de acridina (NA) y azul de toluidina (Fryer *et al.*, 1990). Entre estas tinciones el uso de NA entrega un mayor contraste para una más fácil detección del agente, sobre todo cuando hay un menor número de bacterias en la muestra (Lannan y Fryer, 1991). Por otra parte, la inoculación de tejidos renales en líneas celulares (sin antibióticos), obtenidos de salmones sospechosos, sería el método más definitivo para la detección de *P. salmonis* (Fryer *et al.*, 1990; Cvitanich *et al.*, 1991). Dado que se usan cultivos celulares sin antibióticos para permitir el crecimiento normal de *P. salmonis*, como método rutinario de diagnóstico no sería recomendable, debido a la facilidad de su contaminación. Sin embargo, el método diagnóstico más usado, por su sensibilidad y especificidad, es la inmunofluorescencia indirecta (IFI) desarrollada por Lannan *et al.* (1991), el cual, dado los elevados tiempos de incubación de los anticuerpos, fue modificado mediante el uso de microondas (Larenas *et al.*, 1996a). Para la obtención del antisuero contra la bacteria se inoculó una preparación antigénica de la cepa LF-89 de *P. salmonis* en conejos blancos neozelandeses (Fryer *et al.*, 1991). También se ha desarrollado un ensayo inmunoenzimático (ELISA), para la detección y cuantificación de *P. salmonis* a partir de muestras renales (Aguayo *et al.*, 2002).

Las técnicas habituales para la detección de patógenos involucran el sacrificio de especímenes enfermos para el análisis o caracterización post-mortem de tejidos. Marshall *et al.* (1998) desarrollaron un procedimiento para detectar *P. salmonis* en diminutas muestras de suero de peces (volumen, <5 µL) mediante el uso la técnica “polymerase chain reaction” (PCR). Mauel *et al.*, (1996) han descrito un análisis basado en PCR donde usaban tejidos internos de peces infectados. Se han desarrollado “primers” o partidores (PS2S, PS2AS, PS3AS y EM90AS) que permiten diferenciar *P. salmonis* de otras bacterias, así como la

diferenciación de la cepa EM-90 con la de referencia (LF-89). La sensibilidad y especificidad de esta prueba diagnóstica es altísima, pudiendo incluso llegar a detectar hasta 1 dosis infectante de cultivo de tejido (TCID<sub>50</sub>).

#### **F- Vías de transmisión**

Pese a que Lannan y Fryer (1994) demostraron *in vitro* una baja viabilidad de *P. salmonis* en agua dulce, distintos autores demostraron la transmisión horizontal de la enfermedad en condiciones de agua dulce la cuál se vio favorecida por el contacto entre los peces (Almendras *et al.*, 1997) y al aumentar la densidad poblacional (Salinas *et al.*, 1997). Con respecto a esto último, Salinas *et al.* (1997) lograron mortalidades acumuladas de 4% en densidad poblacional de 20 kg/m<sup>3</sup> y de 14% en 40 kg/m<sup>3</sup>, en poblaciones de truchas arco iris (*O. mykiss*) cohabitantes con otras inoculadas con *P. salmonis* vía IP.

Fryer *et al.* (1990) postularon la posible presencia de vectores marinos que mantendrían al agente en el ambiente. Este postulado adquiere mayor fuerza cuando Venegas (1996) y Correal (1995) demuestran mediante inmunofluorescencia la presencia de *P. salmonis* en los ectoparásitos como *Ceratothoa gaudichaudii* y *Caligus sp.*, en peces como Cabrilla, Jurel, Pejerrey, Róbalo y Merluza, en moluscos como el Chorito y en crustáceos como Picorocos y Copépodos de vida libre, lo cual señala que podrían ser vectores o reservorios marinos del agente. Sin embargo, hasta la fecha no existen antecedentes concretos que permitan afirmar corroborar la importancia de estas especies como vectores o reservorios de piscirickettsiosis.

Experimentalmente se determinó que truchas arco iris (*O. mykiss*) infectadas eliminan a la *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 (*O. mykiss*). Los grupos de salmones fueron desafiados con la bacteria mediante distintas vías. Las vías utilizadas fueron intraperitoneal (IP), sub-cutánea (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 evidencia experimentalmente, la inoculación

subcutánea produce un altísimo porcentaje de mortalidad, por lo que los ectoparásitos infectados podrían jugar un rol en la transmisión horizontal de la enfermedad.

Larenas *et al.* (1996b) lograron reproducir experimentalmente la transmisión vertical, tras obtener ovas (al estado ojo) infectadas, provenientes de machos y/o hembras inoculados IP con *P. salmonis*. En general, el microorganismo fue encontrado en escasa a moderada cantidad dentro de la ova, siendo la ubicación más frecuente en el vitelo. Los reproductores inoculados con *P. salmonis* no presentaron signos ni evidencias a la necropsia de piscirickettsiosis durante la fase experimental, sin embargo en todos los frotis renales de estos peces se encontró altas cantidades del agente inoculado. La bacteria también se encontró en fluido seminal y ovárico, y en ovas no fertilizadas. En un trabajo no publicado, se ha corroborado la transmisión vertical en salmónes coho (*O. kisutch*) naturalmente infectados. Por otro lado, Bustos *et al.* (1994) realizó estudios, aunque no concluyentes, que indicarían la existencia de transmisión vertical en condiciones naturales.

De acuerdo con los resultados obtenidos por Larenas *et al.* (1996b), se comprueba que ya sea el macho o la hembra portadores de *P. salmonis*, pueden transmitir el agente a su prole. Lo anterior difiere de lo obtenido por otras enfermedades de transmisión vertical, como es BKD, donde la fuente principal de diseminación la constituyen las ovas provenientes de hembras infectadas. El agente fue detectado en ovas al estado de ojo, pero la persistencia de la bacteria en etapas posteriores del desarrollo no fue establecida en este trabajo. Dado que *P. salmonis* fue observada en gran número en fluido celómico y fluido seminal, Larenas *et al.* (1996b) postularon que esta bacteria podría penetrar a la ova durante el proceso de fertilización. Esta hipótesis fue probada experimentalmente por Larenas *et al.* (2003), donde obtuvieron ovas fertilizadas infectadas desafiando, con una suspensión de *P. salmonis*, a gametos de reproductores libres de la infección durante el proceso de fertilización.

Larenas *et al.* (2003) demostraron que reproductores machos y hembras inoculados IP con *P. salmonis*, generan alevines de saco infectados viables. En este mismo estudio mediante la observación de la bacteria sobre la ova, por medio de microscopía electrónica de barrido, se detectaron prolongaciones bacterianas que permitían la adhesión de la bacteria a la ova. Estas prolongaciones se denominaron complejo de adhesión piscirickettsial (CAP) y tienen un largo máximo de 2,5  $\mu\text{m}$ , detectándose entre

microorganismos lo cual forma una estructura como panal de abeja. Este CAP se comienza a observar a los 45 segundos después del desafío ova-bacteria. Al minuto se observa algunas bacterias penetrando al interior de la ova a través del corion de esta. A los 5 minutos se observaron bacterias al interior de la ova, las cuales ya no poseen el CAP. La capacidad de *P. salmonis* para adherirse a la ova, para luego penetrarla, fue demostrada en este estudio y se sugiere como posible mecanismo de transmisión vertical.

### **G- 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.

También es aconsejable una pronta extracción, desde 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 *P. salmonis* 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 (*O. kisutch*) y en trucha arco iris (*O. mykiss*) usando inyecciones IP de *P. salmonis*. En una prueba de campo, usando bacterinas de *P. salmonis* inyectadas intraperitonealmente en salmón coho (*O. kisutch*) 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 inmunoprofilaxis 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 mas rápida, precisa y sensible para la determinación de CMI.

Hasta el momento se ha demostrado la infección de ovas de trucha arco iris (*O. mykiss*) con la cepa LF-89 de *P. salmonis* (Larenas *et al.*, 2003). Por otra parte, aún no se ha demostrado la infección de ovas de otras especies salmonídeas con *P. salmonis*. Es por esto que en la presente memoria de título se investigó si esta bacteria es capaz de infectar ovas de salmón del Atlántico (*S. salar*), y además se estudió si existen diferencias en la cinética de infección de estas ovas con las de la especie trucha arco iris (*O. mykiss*) y entre las cepas LF-89 y SLGO-95 de *P. salmonis*. Basado en esto, en la presente memoria de título se buscó contribuir al conocimiento de la infección de *P. salmonis* en ovas de especies de salmónidos, mediante el desafío de ovas de salmón del Atlántico (*S. salar*) y de trucha arco iris (*O. mykiss*) con las cepas LF-89 y SLGO-95.

## **OBJETIVO GENERAL**

- Aportar al conocimiento de la cinética de infección de *Piscirickettsia salmonis* en ovas de especies salmonídeas.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Aplicar la técnica de “dot-blot” para detectar la infección de ovas de salmón del Atlántico (*Salmo salar*) y trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) con *P. salmonis*.
- Detectar y comparar la cinética de la infección de ovas de salmón del Atlántico (*S. salar*) con las cepas de *P. salmonis*, LF-89 y SLGO-95.
- Comparar la cinética de la infección entre ovas de salmón del Atlántico y ovas de trucha arco iris con las cepas de *P. salmonis*, LF-89 y SLGO-95.
- Observar la infección de las cepas de *P. salmonis*, LF-89 y SLGO-95, en ovas de salmón del Atlántico (*Salmo salar*), mediante microscopía electrónica de barrido.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Este trabajo se desarrolló en las unidades de Anatomía Patológica y de Patología de Organismos Acuáticos del Departamento de Patología Animal y en el Laboratorio de Bioquímica y Química del Departamento de Ciencias Biológicas Animales, ambas pertenecientes a la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

### **A- Cinética de infección en ovas de salmón del Atlántico y trucha arco iris con dos cepas de *Piscirickettsia salmonis***

#### **A.1- Ovas**

Se emplearon ovas de salmón del Atlántico (*Salmo salar*) y de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) que fueron gentilmente donadas por la empresa Marine Harvest Chile y obtenidas de reproductores seleccionados, libres de la infección por *Piscirickettsia salmonis*, *Renibacterium salmoninarum* y el virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPN, “Infectious pancreatic necrosis”). 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. El tiempo transcurrido desde que las ovas fueron extraídas desde de los reproductores y usadas en los experimentos fue menor a las 24 h.

#### **A.2- Bacteria**

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

Durante un desafío de ovas previo, donde se expusieron ovas de salmón del Atlántico (*S. salar*), la cepa bacteriana usada (SLGO-95) fue multiplicada en el cultivo celular con MEM y suplementado con 10% de suero fetal bovino (MEM-10). En el desafío de ovas principal, donde se usó ovas tanto de la especie salmón del Atlántico (*S. salar*) como trucha arco iris (*O. mykiss*), ambas cepas usadas como desafío (SLGO-95 y LF-89) se

multiplicaron en el cultivo celular con medio esencial mínimo (MEM), sin suplemento de suero fetal.

El período de multiplicación de la *P. salmonis* se dio por finalizado una vez que se observó un efecto citopático (ECP) lo más cercano al 100%, que coincidiera con la llegada de las ovas enviadas por Marine Harvest Chile. Previo a utilizar la suspensión bacteriana, ésta fue pasada a través de un filtro millipore®, con poro de un diámetro de 5 µm.

### **A.3- Desafío de ovas con las cepas SLGO-95 y LF-89 de *P. salmonis***

Previo al desafío principal, detallado en el párrafo siguiente, se desafió 18 ovas de la especie salmón del Atlántico (*O. mykiss*) con una suspensión bacteriana de *P. salmonis* cepa SLGO-95 (A.2 de Materiales y Métodos) durante los mismos seis tiempos usados para el desafío principal. Las suspensiones de desafío fueron: SLGO-95, denominada ahora en adelante como SLGO $\alpha$ , SLGO-95 muerta (SLGO $m$ ) y medio esencial mínimo con suero fetal bovino (MEM-10).

Para el desafío principal, se seleccionaron 2 conjuntos de 18 ovas de cada especie salmonídea (salmón del Atlántico y trucha arco iris), las cuales fueron desafiadas con una de las diferentes suspensiones y tiempos de incubación, de acuerdo al protocolo que se establece más adelante en la tabla 1. Cada conjunto de ovas, se dividió en seis grupos según el tipo de tratamiento: SLGO-95 (SLGO $\beta$ ), SLGO-95 muerta (SLGO $m$ ), medio esencial mínimo (MEM), LF-89 (LF) y LF-89 muerta (LF $m$ ). Alícuotas de suspensiones de SLGO $\beta$  y LF, dentro de un tubo eppendorf®, fueron sumergidas en agua en ebullición por un periodo de 5 min para producir la muerte de la bacteria. Estas suspensiones fueron denominadas como SLGO $m$  y LF $m$ , respectivamente. Cabe señalar que las cepas usadas en este desafío de ovas, provinieron de botellas de cultivo celular distintas al del desafío previo.

Doce ovas de cada especie se colocaron en forma individual dentro de tubos eppendorf®. A seis ovas de cada especie se les agregó 400 µL de suspensión de cultivo bacteriano SLGO $\beta$  y a las otras seis se les agregó una cantidad similar de suspensión de cultivo bacteriano LF, las que fueron desafiadas con cada cepa bacteriana durante seis tiempos de incubación (1, 3, 5, 10, 30 y 60 min). Para establecer que el proceso de infección de la *P. salmonis* a la ova era de carácter activo, se utilizó como control, cuatro ovas de cada especie, donde a dos de cada una se les agregó 400 µL de la suspensión

SLGOm, durante 5 y 30 min respectivamente, y las otras dos fueron tratadas con la suspensión LFm, durante los mismos tiempos. Se utilizó además, dos ovas de cada especie como controles negativos, a las cuales se les agregó 400 µL de MEM durante 5 y 60 min, respectivamente.

Para interrumpir los desafíos, se eliminó la suspensión de cada tubo eppendorf® y se lavó la ova mediante tres enjuagues consecutivos con 1 mL de PBS (pH=7,4). Luego las muestras fueron congeladas a -70° C. Como control de viabilidad de las cepas bacterianas, se inoculó una parte del sobrenadante bacteriano utilizado en esta experiencia, en la línea CHSE-214 para demostrar su posterior multiplicación a través de la formación de ECP.

En la tabla 1 se muestra el esquema desafío utilizado tanto para las ovas de salmón del Atlántico (*S. salar*) como para las ovas de trucha arco iris (*O. mykiss*).

**Tabla 1.** Esquema del desafío para ovas de dos especies salmonídeas con las cepas SLGO-95 y LF-89 *Piscirickettsia salmonis*.

| Suspensiones de desafío     | Tiempo de desafío (min) |   |   |    |    |    |
|-----------------------------|-------------------------|---|---|----|----|----|
|                             | 1                       | 3 | 5 | 10 | 30 | 60 |
| Cepa SLGO-95 (SLGOβ)        | O                       | O | O | O  | O  | O  |
| Cepa SLGO-95 muerta (SLGOm) |                         |   | O |    | O  |    |
| Medio esencial mínimo (MEM) |                         |   | O |    |    | O  |
| Cepa LF-89 (LF)             | O                       | O | O | O  | O  | O  |
| Cepa LF-89 muerta (LFm)     |                         |   | O |    | O  |    |

Luego de descongelar las ovas 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.4- Preparación de la muestra para el “dot-blot”**

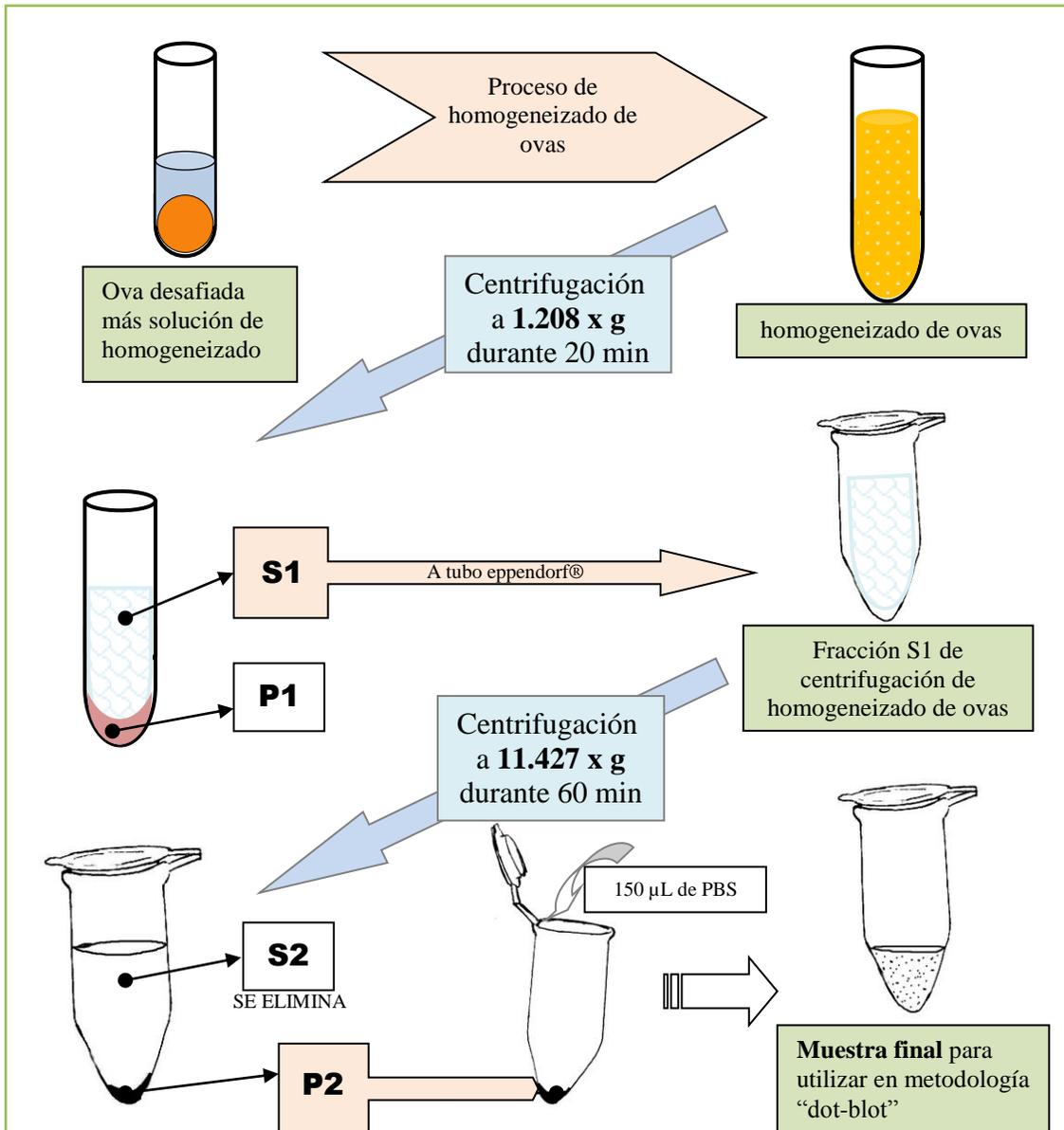
Para que las ovas, desafiadas con las distintas suspensiones, pudieran ser usadas en la metodología “dot-blot”, se las sometió previamente a un procedimiento de homogeneizado. Cada ova se colocó en un tubo con una solución de homogeneizado en presencia de inhibidores de proteasas (Anexo 1) para luego ser triturada y homogeneizada, dejándola así en condiciones de pasar al proceso de centrifugado.

Luego los homogeneizados fueron centrifugados a 1.208 x g durante 20 min, a partir del cuál se obtuvo una fracción sobrenadante (S1) y un precipitado (P1). La fracción S1 se centrifugó a 11.427 x g por 60 min, para concentrar las bacterias en un precipitado denominado como P2 y separarlas de la fracción sobrenadante (S2). El precipitado P2, resuspendido en 150 µL, se utilizó como muestra final para ser analizado mediante la metodología “dot-blot”. Este procedimiento se esquematiza en la figura 1 y se detalla en el Anexo 1.

#### **A.5- Metodología “dot-blot”**

Para realizar esta técnica se utilizó el aparato BioDot<sup>®</sup> (BioDot<sup>®</sup> “apparatus”, BioRad<sup>®</sup>) y una membrana de polivinildifluoruro (PVDF) (Inmun-Blot<sup>®</sup> PVDF “membrane for protein blotting” 0,2 µm, BioRad<sup>®</sup>). Las muestras a utilizar se colocaron en las celdas del BioDot<sup>®</sup>, 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<sup>®</sup> 0,005%), con el fin de evitar una interacción inespecífica de anticuerpos con proteínas contaminantes. A continuación las membranas fueron sometidas a tres 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<sup>®</sup>, BiosChile<sup>®</sup>) 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 se incubó nuevamente la membrana durante 1 h con un segundo anticuerpo anti-IgG de ratón (InmunoPure<sup>®</sup> “antibody horseradish peroxidase”, Pierce<sup>®</sup>) que estaba conjugado a una 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<sup>®</sup> “west dura extended duration substrate”, Pierce<sup>®</sup>). La reacción positiva se evidenció 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 se expuso durante tiempos que variaron entre 2 y 30 min a películas fotosensibles (CL-X Posure<sup>®</sup>, Pierce<sup>®</sup>), 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.



**Figura 1.** Esquema del proceso de homogeneizado 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”.

#### A.6- Determinación, mediante la metodología “dot-blot”, de la cinética de infección de *P. salmonis* en ovas de dos especies salmonídeas desafiadas con las cepas SLGO-95 y LF-89

Según la estandarización de la metodología “dot-blot” (Gatica, 2007), para la detección de *P. salmonis*, el tiempo normal de exposición de la membrana PVDF a la película fotosensible, para que esta genere una buena positividad, no es superior a los 5

min. En la presente memoria de título, dado la dificultad de conseguir resultados positivos claros incluso en controles positivos durante una primera experiencia de “dot-blot”, se aumentaron los tiempos de exposición de la membrana PVDF con la finalidad de incrementar el número de píxeles generados por una misma muestra en distintas películas fotosensibles.

A continuación, se describen tres experiencias desarrolladas, la primera usando muestras provenientes de un desafío previo al principal donde se usó ovas de salmón del Atlántico (*S. salar*) con la cepa SLGO-95, mientras que la segunda y tercera experiencia corresponden a “dot-blot” de muestras de ovas del desafío principal, donde se usó ovas de dos especies de salmónidos frente a dos cepas de *P. salmonis*.

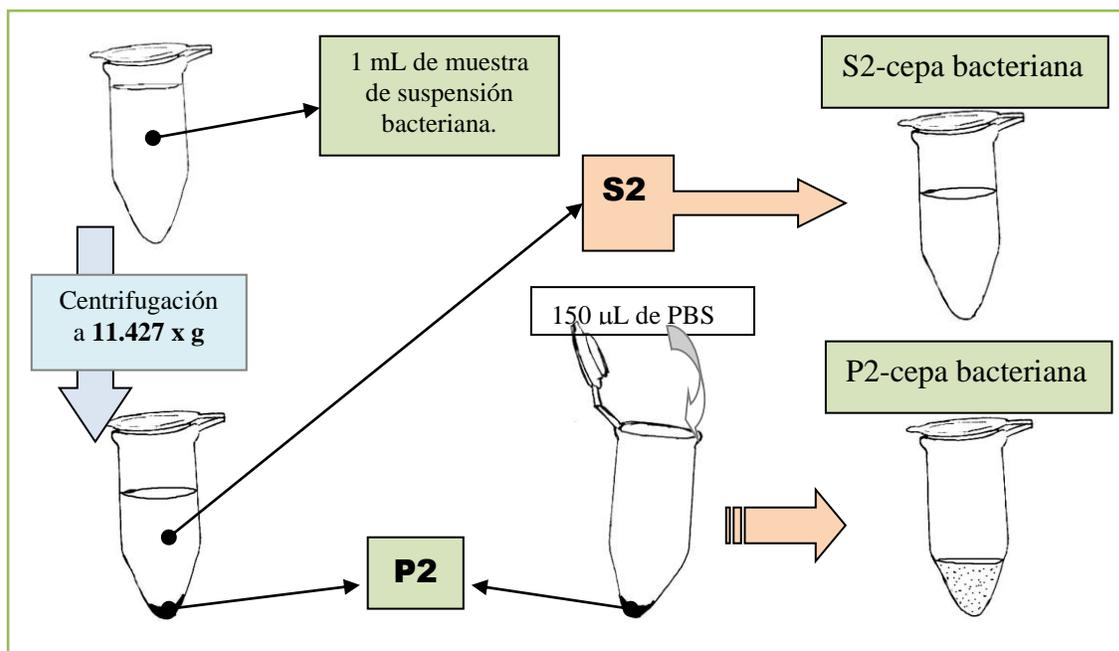
#### **A.6.1- Primera experiencia**

Se realizó la metodología “dot-blot” de detección de *P. salmonis* de una serie de muestras. La membrana de PVDF usada se expuso a una película fotosensible durante distintos tiempos (2, 5 y 8 min). Todas las muestras se cargaron en el aparato BioDot® en volúmenes de 30 µL.

Se usó muestras provenientes de un desafío de ovas de salmón del Atlántico (*S. salar*) previo al desafío principal (A.3 de Materiales y Métodos). Un grupo provino de seis ovas desafiadas con la suspensión de SLGO $\alpha$  durante 1, 3, 5, 10, 30 y 60 min; estas muestras fueron denominadas SLGO<sub>1</sub>, SLGO<sub>3</sub>, SLGO<sub>5</sub>, SLGO<sub>10</sub>, SLGO<sub>30</sub> y SLGO<sub>60</sub>, según el tiempo de exposición. Como controles se utilizaron muestras de dos ovas controles desafiadas con MEM (MEM<sub>5</sub> y MEM<sub>60</sub>) durante 5 y 60 min, respectivamente. Además, muestras de otras dos ovas se les agregó SLGO<sub>m</sub> (SLGO<sub>m5</sub> y SLGO<sub>m30</sub>), durante 5 y 30 min, respectivamente. Como control positivo del desafío de ovas de salmón del Atlántico (*S. salar*), se usó una alícuota de SLGO $\alpha$  (bacteria viva) que había sido usada como desafío.

En la misma experiencia, también se cargó una muestra de *P. salmonis* cepa SLGO-95 (SLGO\*) proveniente de una botella de cultivo celular distinta a la usada en el desafío de ovas. Esta suspensión bacteriana, se usó en un experimento piloto donde fue centrifugada a 11.427 x g (figura 2), y de esta manera se obtuvo una fracción S2 y otra P2. De estas fracciones se usó la S2 (S2-SLGO\*) y P2 resuspendida en 150 µL de PBS (P2-SLGO\*). Además se usó, como control positivo de la metodología, una muestra de *P.*

*salmonis* cepa LF-89 (LF\*) usada en “dot-blot” anteriores a esta memoria de título, la cuál es conocida por su positividad a este procedimiento. El protocolo de centrifugación para purificar o concentrar suspensiones bacterianas de *P. salmonis* se basó en lo realizado por Jamett *et al.* (2001) y modificado por Gatica (2007).



**Figura 2.** Procedimiento de centrifugación de suspensiones bacterianas para su posterior uso en “dot-blot”.

Para todas las muestras usadas en esta experiencia se determinó la concentración de proteínas totales por el método espectrofotométrico de Lowry (Lowry *et al.*, 1951), usando como estándar albúmina sérica bovina (A.1, Anexo 2).

### A.6.2- Segunda experiencia

En esta experiencia se realizó la metodología “dot-blot” de detección de *P. salmonis* de una serie de muestras. En estos experimentos, la membrana de PVDF usada se expuso a la película fotosensible durante distintos tiempos (2, 5, 8, 10, 20 y 30 min). Todas las muestras se cargaron en el aparato BioDot® en volúmenes de 30 µL.

Se usó muestras de ovas de salmón del Atlántico (*S. salar*) provenientes del desafío principal con dos cepas de *P. salmonis*. A todas las siglas de muestras provenientes de estas ovas se antepone “A-” como nomenclatura. Un grupo de estas muestras provenían de seis ovas desafiadas con la suspensión SLGOβ (A-SLGO<sub>1</sub>, A-SLGO<sub>3</sub>, A-SLGO<sub>5</sub>, A-SLGO<sub>10</sub>, A-SLGO<sub>30</sub> Y A-SLGO<sub>60</sub>) y otras seis con la suspensión LF (A-LF<sub>1</sub>, A-LF<sub>3</sub>, A-LF<sub>5</sub>, A-LF<sub>10</sub>,

A-LF<sub>30</sub> Y A-LF<sub>60</sub>) durante los seis distintos tiempos de incubación (1, 3, 5, 10, 30 y 60 min). Otro grupo provino de ovas desafiadas con las suspensiones SLGO<sub>m</sub> (A-SLGO<sub>m5</sub> y A-SLGO<sub>m30</sub>) durante 5 y 30 min respectivamente, y LF<sub>m</sub> (A-LF<sub>m5</sub> y A-LF<sub>m30</sub>), durante los mismos tiempos. Se utilizó además muestras de dos ovas desafiadas con la suspensión MEM (A-MEM<sub>5</sub> y A-MEM<sub>60</sub>) durante 5 y 60 min, respectivamente. Estas muestras se cargaron en membranas PVDF que se expusieron a cuatro películas, durante cuatro tiempos distintos (2, 5, 8 y 20 min). Como controles positivo de la cinética, se usó muestras de SLGO $\beta$  y LF usadas como desafío de ovas de salmón del Atlántico (*S. salar*). Las membranas PVDF con estos dos controles fueron expuestas a seis películas en seis tiempos (2, 5, 8, 10, 20 y 30 min).

Durante el proceso de centrifugado de las ovas de salmón del Atlántico (*S. salar*) se guardó la fracción S2 (figura 1), producto del centrifugado a 11.427 x g, de la muestras A-SLGO<sub>10</sub>, A-SLGO<sub>60</sub>, A-LF<sub>10</sub> y A-LF<sub>60</sub>. Estas muestras S2 (S2A-SLGO<sub>10</sub>, S2A-SLGO<sub>60</sub>, S2A-LF<sub>10</sub> y S2A-LF<sub>60</sub>) fueron usadas para la detección de *P. salmonis* mediante “dot-blot”, donde se obtuvo dos películas expuestas a la membrana PVDF en los tiempos 10 y 30 min. También se usó una muestra de *P. salmonis* cepa LF-89 (LF\*) perteneciente a una botella de cultivo celular distinta a la usada en el presente desafío de ovas de salmón del Atlántico (*S. salar*), también usada en la primera experiencia (A.6.1, Materiales y Métodos), la cuál se expuso a la película durante seis tiempos (2, 5, 8, 10, 20 y 30 min). A partir de una alícuota de LF\* y de SLGO $\beta$ , las que se centrifugaron a 11.427 x g, se obtuvieron una fracción S2 y otra P2. De estas fracciones se usó las muestras de S2 (S2-LF\* y S2-SLGO $\beta$ ) y P2 resuspendida en 150  $\mu$ L de PBS (P2-LF\* y P2-SLGO $\beta$ ) (figura 2). Estas últimas muestras se cargaron en una membrana PVDF que se expuso a dos películas durante 10 y 30 min respectivamente.

Durante el proceso de centrifugado de ovas se guardó la fracción P1, producto de la centrifugación a 1.208 x g, de las muestras SLGO<sub>5</sub> y LF<sub>5</sub> (P1A-SLGO<sub>5</sub> Y P1A-LF<sub>5</sub>, respectivamente). A partir de cada muestra de P1 se obtuvo dos alícuotas, un par se hirvió dentro de tubos eppendorf® a baño maría durante 5 min (P1hA-SLGO<sub>5</sub> y P1hA-LF<sub>5</sub>) y el otro par se mantuvo tal cuál (P1A-SLGO<sub>5</sub> y P1A-LF<sub>5</sub>). Estas muestras de P1 fueron cargadas en una membrana PVDF que se expuso a dos películas durante 10 y 30 min respectivamente.

Para alguna de las muestras usadas en esta segunda experiencia se determinó la concentración de proteínas totales por el método espectrofotométrico de Lowry (Lowry *et al.*, 1951), usando como estándar albúmina sérica bovina (A.2, Anexo 2).

### **A.6.3- Tercera experiencia**

En estos experimentos, la membrana de PVDF usada se expuso a la película fotosensible durante dos tiempos (20 y 30 min).

Se usó muestras de ovas de trucha arco iris (*O. mykiss*) provenientes del desafío principal con dos cepas de *P. salmonis*. El sobrenadante bacteriano usado, para ambas cepas, provino de las mismas botellas de cultivo celular (CHSE-214) usadas para el desafío de ovas de salmón del Atlántico (*S. salar*) (A.6.2 de Materiales y Métodos). A todas las siglas de muestras provenientes de ovas de trucha arco iris (*O. mykiss*) se antepone “T-” como nomenclatura. Un grupo de estas muestras provenían de seis ovas desafiadas con la suspensión SLGOβ (T-SLGO<sub>1</sub>, T-SLGO<sub>3</sub>, T-SLGO<sub>5</sub>, T-SLGO<sub>10</sub>, T-SLGO<sub>30</sub> y T-SLGO<sub>60</sub>) y otras seis con la suspensión LF (T-LF<sub>1</sub>, T-LF<sub>3</sub>, T-LF<sub>5</sub>, T-LF<sub>10</sub>, T-LF<sub>30</sub> Y T-LF<sub>60</sub>) durante los seis distintos tiempos de incubación (1, 3, 5, 10, 30 y 60 min). Otro grupo provino de ovas desafiadas con las suspensiones SLGOm (T-SLGOm<sub>5</sub> y T-SLGOm<sub>30</sub>) durante 5 y 30 min respectivamente, y LFm (T-LFm<sub>5</sub> y T-LFm<sub>30</sub>), durante los mismos tiempos. Se utilizó además muestras de dos ovas desafiadas con la suspensión MEM (T-MEM<sub>5</sub> y T-MEM<sub>60</sub>) durante 5 y 60 min, respectivamente. Todas estas muestras se cargaron en membranas PVDF que se expusieron a dos películas, durante dos tiempos distintos (10 y 30 min) y se cargaron en el aparato BioDot<sup>®</sup> en volúmenes de 30 µL. Como controles positivo de la cinética, se usó las muestras de SLGO-95 (SLGOβ) y LF-89 (LF) usadas como desafío de ovas de trucha arco iris (*O. mykiss*) señaladas anteriormente, y cada una se cargó en volúmenes de 15 y 30 µL. Estas muestras de ambas cepas de *P. salmonis* provenían de las mismas botellas de cultivo celular a las usadas como desafío de ovas de salmón del Atlántico (*S. salar*) (A.6.2, Materiales y Métodos). Las membranas PVDF con estos dos controles fueron expuestas a dos películas en dos tiempos (10 y 30 min).

Basándose en resultados de la segunda experiencia, durante el proceso de centrifugado de las ovas de trucha arco iris (*O. mykiss*) se guardó la fracción S2 (figura 1), producto del centrifugado a 11.427 x g, de todas las muestras de ovas desafiadas con ambas cepas de *P. salmonis*. Estas muestras S2, tanto las desafiadas con SLGO-95 (S2T-SLGO<sub>1</sub>,

S2T-SLGO<sub>3</sub>, S2T-SLGO<sub>5</sub>, S2T-SLGO<sub>10</sub>, S2T-SLGO<sub>30</sub> y S2T-SLGO<sub>60</sub>) como con LF-89 (S2T-LF<sub>1</sub>, S2T-LF<sub>3</sub>, S2T-LF<sub>5</sub>, S2T-LF<sub>10</sub>, S2T-LF<sub>30</sub> y S2T-LF<sub>60</sub>), fueron usadas para la detección de *P. salmonis* mediante “dot-blot”, donde se obtuvo dos películas expuestas a la membrana PVDF en los tiempos 10 y 20 minutos. Para estas muestras, se cargó volúmenes de 30 µL sobre la membrana PVDF.

Para todas las muestras S2 provenientes de ovas usadas en esta tercera experiencia se determinó la concentración de proteínas totales por el método espectrofotométrico de Lowry (Lowry *et al.*, 1951), usando como estándar albúmina sérica bovina (A.3, Anexo 2).

## **B- Observación mediante microscopía electrónica de barrido (MEB) de la infección de ovas de salmón del Atlántico y trucha arco iris con dos cepas de *P. salmonis***

### **B.1- Procesamiento y observación de muestras para MEB**

Se procesaron muestras de ovas de salmón del Atlántico (*S. salar*) y trucha arco iris (*O. mykiss*) desafiadas durante 5 min con las cepas LF-89 y SLGO-95 de *P. salmonis*. Además como control se procesó una ova de cada especie, incubadas durante 5 min en MEM. El método de procesamiento para MEB que se señala a continuación está de acuerdo a lo descrito por Quinteros (2006).

Las ovas de ambas especies salmonídeas usadas en la cinética de desafío, luego de ser desafiada con suspensiones bacterianas (LF-89 y SLGO-95) durante 5 min, fueron fijadas en glutaraldehído al 3% en solución tampón cacodilato de sodio (0,1 M) a temperatura ambiente durante 24 h. Posteriormente, las muestras fueron lavadas dos veces en solución tampón cacodilato de sodio 0,1 M por 30 min. Terminado el lavado, las muestras fueron deshidratadas en concentraciones crecientes de acetona (30, 50, 70, 95 y 100%), haciendo tres recambios de la misma concentración cada 20 min a excepción de la última concentración (100%) en la cual se hizo tres recambios cada 60 min. Posteriormente fueron llevadas al secado de punto crítico y sombreadas con oro con un espesor de 20 nm. Las muestras se guardaron al vacío en un desecador hasta el momento de su observación en un microscopio de barrido.

## **C.- Análisis de resultados**

Respecto al análisis de resultados de los “dot-blot”, la reacción quimioluminiscente entre la peroxidasa del segundo anticuerpo y el sustrato quedó registrada en la película fotosensible, indicando la presencia de *P. salmonis* en la muestra. Para analizar los resultados se cargó en el BioDot® una muestra de sobrenadante de cultivo celular de cada cepa *P. salmonis* usada en desafíos, cuyos píxeles totales, medidos por densitometría, corresponderían 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. Para comparar los resultados entre las dos cepas y entre las dos especies de ovas se realizaría un análisis estadístico por medio de la prueba de “t-Student” para dos medias aritméticas.

Por otra parte, para el análisis de las imágenes de las muestras sometidas a MEB, estas fueron fotografiadas con película de formato 120, obteniéndose negativos donde se realizaron, cuando correspondía, mediciones de estructuras asociadas a las ovas, así como de las bacterias. Todos los negativos fueron digitalizados al formato de compresión JPG mediante un escáner de color, las transparencias y las imágenes obtenidas fueron finalmente transformadas a positivo mediante un programa computacional de edición de imágenes (“602 Pro PC Suite Photoeditor v. 200b”).

## RESULTADOS

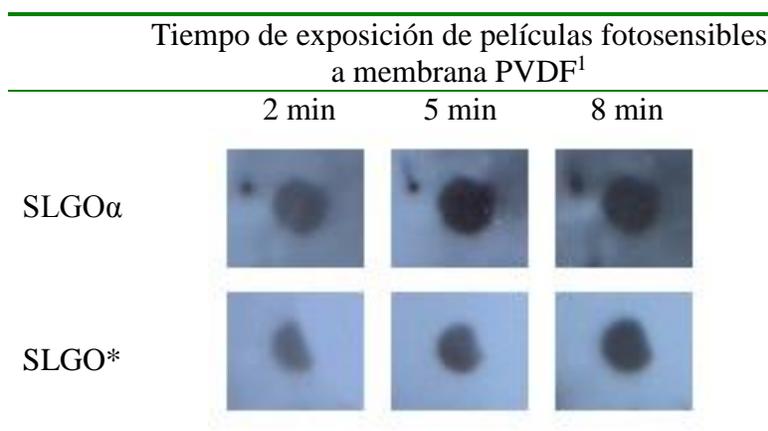
### A.- Determinación, mediante la metodología “dot-blot”, de la cinética de infección de *Piscirickettsia salmonis* en ovas de dos especies salmonídeas desafiadas con las cepas SLGO-95 y LF-89

#### A.1- Primera experiencia

Cabe recordar, como se indicó en el punto A.6.1 de Material y Métodos, que las muestras usadas en esta primera experiencia corresponden a ovas de la especie salmón del Atlántico (*Salmo salar*) desafiadas con la cepa SLGO-95 de *Piscirickettsia salmonis*.

##### A.1.1- Controles positivos

La muestra de bacteria usada en el desafío (SLGO $\alpha$ ), que fue cargada como control positivo de la detección de *P. salmonis*, generó positividad en las películas expuestas a la membrana PVDF durante los tres tiempos de exposición (2, 5 y 8 min), al igual que la muestra SLGO\*. Ambas muestras pueden observarse a continuación en la figura 3.



**Figura 3.** Puntos de positividad al “dot-blot” de muestras de dos sobrenadantes de cultivo celular (CHSE-214), pasados por un filtro millipore de 5 $\mu$ , infectadas con la cepa SLGO-95 de *Piscirickettsia salmonis*. Cada muestra bacteriana proviene de botellas de cultivo celular diferentes; SLGO $\alpha$ , usada en el primer desafío de ovas de salmón del Atlántico (*Salmo salar*), y SLGO\*, proveniente de otra botella de cultivo celular con el mismo número de pasajes y un efecto citopático similar. En la imagen se puede observar que, en los tres tiempos de exposición de la película fotosensible a la membrana PVDF<sup>1</sup>, ambos controles positivos generan puntos de positividad.

1- Membrana de polivinildifluoruro (Immun-Blot<sup>®</sup> PVDF “membrane for protein blotting” 0,2  $\mu$ m, BioRad<sup>®</sup>).

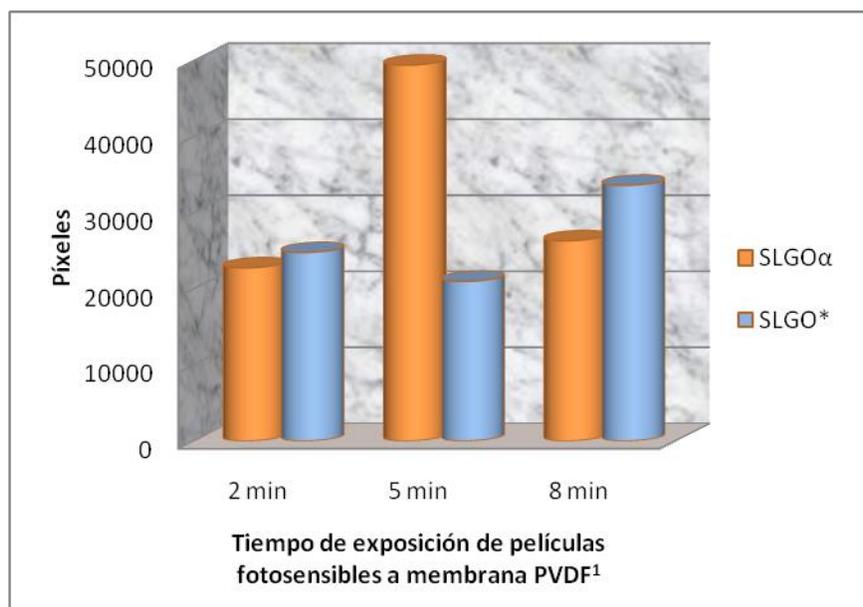
Mediante el análisis densitométrico, con el “software” “Un-ScanIt<sup>®</sup>”, se demostró que la muestra SLGO $\alpha$  presentó una mayor cantidad de píxeles en la película fotosensible expuesta durante 5 min a la quimioluminiscencia de la membrana PVDF. En cambio la

muestra SLGO\* generó un pixelaje mayor en la película con el tiempo mayor de exposición (8 min) a la membrana PVDF. Estos datos se muestran en la tabla 2 y gráfico 1.

**Tabla 2.** Píxeles, calculados mediante densitometría, generados por las muestras SLGO $\alpha$ <sup>1</sup> y SLGO\*<sup>2</sup> en las películas correspondientes a los tres tiempos de exposición a la membrana PVDF<sup>3</sup>.

| Muestras sometidas a “dot-blot” | Tiempo de exposición de películas fotosensibles a membrana PVDF <sup>3</sup> |        |        |
|---------------------------------|--|--------|--------|
|                                 | 2 min  | 5 min  | 8 min  |
| SLGO $\alpha$ <sup>1</sup>      | 22.792   | 49.430 | 26.351 |
| SLGO* <sup>2</sup>              | 24.806   | 27.018 | 33.639 |

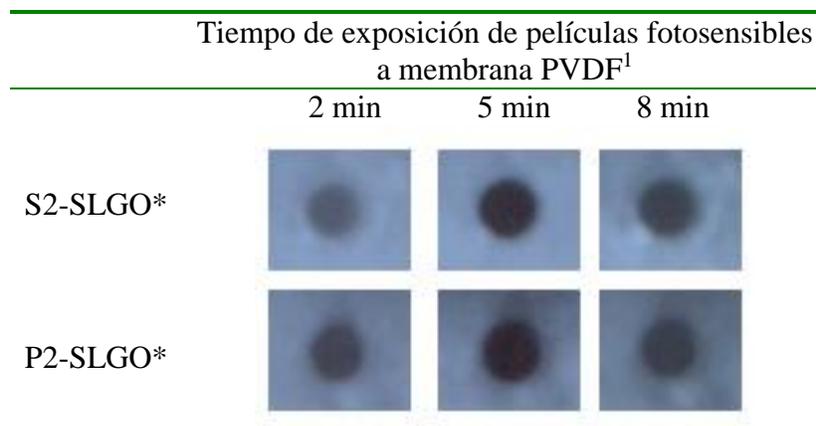
1. SLGO-95 (pasaje 10) usada como desafío de ovas de salmón del Atlántico (*Salmo salar*).
2. SLGO-95 (pasaje 10) perteneciente a una botella de cultivo distinta a la usada en el desafío de ovas de salmón del Atlántico (*S. salar*).
3. Membrana de polivinildifluoruro (Inmun-Blot<sup>®</sup> PVDF “membrane for protein blotting” 0,2  $\mu$ m, BioRad<sup>®</sup>).



**Gráfico 1.** Píxeles generados por las muestras SLGO $\alpha$  y SLGO\* (controles positivos de “dot-blot” en primera experiencia) en tres películas fotosensibles durante sus tres respectivos tiempos de exposición a la membrana PVDF<sup>1</sup>. En el caso de SLGO $\alpha$  (suspensión bacteriana de cepa SLGO-95, usada en desafío de ovas), esta alcanzó un mayor número de píxeles a los 5 min de exposición de la película a la membrana PVDF<sup>1</sup>, mientras que SLGO\* (suspensión bacteriana de cepa SLGO-95, de botella de cultivo celular distinta a SLGO $\alpha$ ) lo alcanzó a los 8 min.

1- Membrana de polivinildifluoruro (Inmun-Blot<sup>®</sup> PVDF “membrane for protein blotting” 0,2  $\mu$ m, BioRad<sup>®</sup>).

Las muestras obtenidas de la centrifugación a 11.427 x g de una alícuota de SLGO\* (S2-SLGO\* y P2-SLGO\*) generaron positividad en los tiempos de exposición 2, 5 y 8 min, como se puede observar en la figura 4.



**Figura 4.** Puntos de positividad al “dot-blot” de muestras resultantes de la centrifugación a 11.427 x g de una alícuota de sobrenadante de cultivo celular (CHSE-214) infectado con la cepa SLGO-95 de *Piscirickettsia salmonis* (SLGO\*). Ambas muestras derivadas de SLGO\*, la fracción sobrenadante (S2), denominada S2-SLGO\*, y la fracción precipitada (P2), denominada P2-SLGO\*, fueron positivas en las tres películas fotosensibles expuestas cada una durante tres tiempos a la membrana PVDF<sup>1</sup>.

1- Membrana de polivinildifluoruro (Immun-Blot® PVDF “membrane for protein blotting” 0,2 µm, BioRad®).

Las mediciones densitométricas de las muestras S2-SLGO\* y P2-SLGO\* mostraron una mayor cantidad de píxeles en la película expuesta durante 5 min a la membrana. En este caso, la muestra P2-SLGO\* correspondió al 55,5% respecto a la suma de los píxeles generados por ella y S2-SLGO\*. Esta relación no se repitió en las películas expuestas durante 2 y 8 min. Mayor detalle respecto a estos valores se muestra a continuación en la tabla 3 y el gráfico 2.

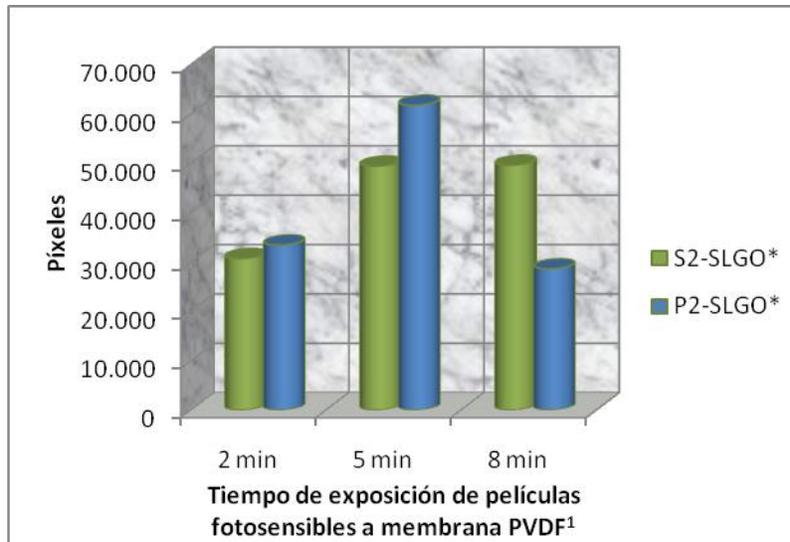
**Tabla 3.** Píxeles, calculados mediante densitometría, generados por las muestras S2-SLGO\*<sup>1</sup> y P2-SLGO\*<sup>2</sup> en los tres tiempos de exposición de la membrana PVDF<sup>3</sup> a cada película.

| Muestras sometidas a “dot-blot” | Tiempo de exposición de películas fotosensibles a membrana PVDF <sup>3</sup> |            |         |            |         |            |
|---------------------------------|--|------------|---------|------------|---------|------------|
|                                 | 2 min  |            | 5 min   |            | 8 min   |            |
|                                 | Píxeles  | Porcentaje | Píxeles | Porcentaje | Píxeles | Porcentaje |
| S2-SLGO* <sup>1</sup>           | 30.722   | 47,9       | 49.430  | 44,5       | 49.617  | 63,4       |
| P2-SLGO* <sup>2</sup>           | 33.450   | 52,1       | 61.763  | 55,5       | 28.629  | 36,6       |

1. Fracción sobrenadante (S2) producto de la centrifugación a 11.427 x g de una cepa viva de SLGO-95.

2. Fracción precipitada (P2) producto de la centrifugación a 11.427 x g de una cepa viva de SLGO-95.

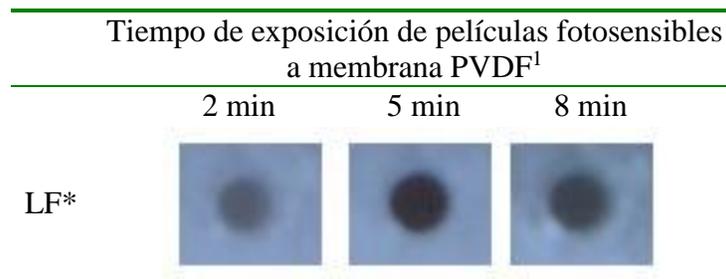
3. Membrana de polivinildifluoruro (Immun-Blot® PVDF “membrane for protein blotting” 0,2 µm, BioRad®).



**Gráfico 2.** Píxeles generados al “dot-blot” por las fracciones, sobrenadante (S2-SLGO\*<sup>2</sup>) y precipitado (P2-SLGO\*<sup>3</sup>), resultantes de la centrifugación de la cepa SLGO-95 de *Piscirickettsia salmonis*.

1. Membrana de polivinildifluoruro (Inmun-Blot® PVDF “membrane for protein blotting” 0,2 µm, BioRad®).
2. Fracción sobrenadante (S2) producto de la centrifugación a 11.427 x g de una cepa viva de SLGO-95.
3. Fracción precipitada (P2) producto de la centrifugación a 11.427 x g de una cepa viva de SLGO-95.

En relación con la muestra LF\*, esta generó positividad en todos los tiempos de exposición de la película fotosensible (2, 5 y 8 min), lo que se puede observar en la figura 5.



**Figura 5.** Puntos de positividad generados por una muestra, LF\*, de sobrenadante de cultivo celular (CHSE-214) infectado con la cepa LF-89 de *Piscirickettsia salmonis* sometida a “dot-blot”. El cultivo celular fue utilizado con un 100% de efecto citopático, y corresponde a una muestra que ya había sido utilizada con éxito durante el proceso de estandarización de la metodología “dot-blot” (Gatica, 2007). LF\* generó puntos de positividad en las tres películas fotosensibles usadas para observar resultados.

1. Membrana de polivinildifluoruro (Inmun-Blot® PVDF “membrane for protein blotting” 0,2 µm, BioRad®).

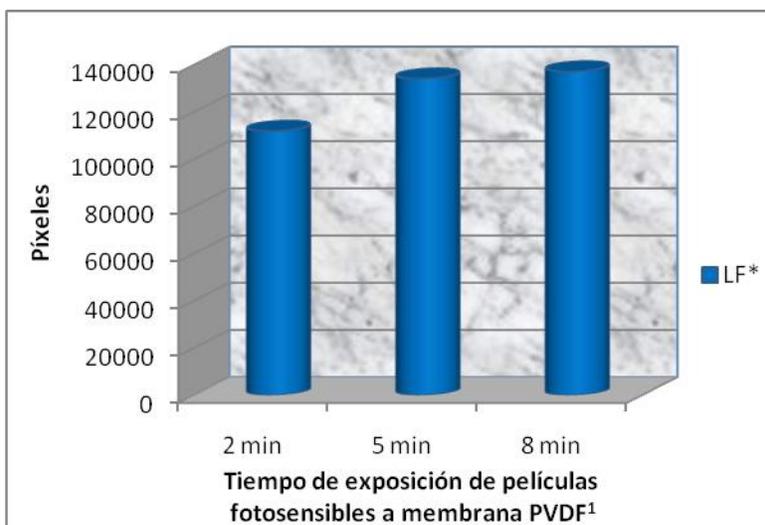
Los resultados de la medición de densitometría de los puntos generados por la muestra LF\* en las películas, mostraron un mayor número de píxeles a los 8 min de exposición a la quimioluminiscencia. Los datos se muestran en la tabla 4 y el gráfico 3.

**Tabla 4.** Píxeles, calculados mediante densitometría, generados por la muestra LF\*<sup>1</sup> en tres distintas películas expuestas durante tres tiempos (2, 5 y 8 min) a la membrana PVDF<sup>2</sup>.

| Muestras sometidas a “dot-blot” | Tiempo de exposición de películas fotosensibles a membrana PVDF <sup>2</sup> |         |         |
|---------------------------------|--|---------|---------|
|                                 | 2 min  | 5 min   | 8 min   |
| LF* <sup>1</sup>                | 111.934  | 134.116 | 137.147 |

1. Cepa LF-89 de *Piscirickettsia salmonis* usada en desafíos de ovas de trucha arco iris (*O. mykiss*) durante el proceso de estandarización del método “dot-blot” (Gatica, 2007).

2. Membrana de polivinildifluoruro (Immun-Blot® PVDF “membrane for protein blotting” 0,2 µm, BioRad®).



**Gráfico 3.** Píxeles generados por la muestra LF\* en tres distintas películas expuestas durante tres tiempos (2, 5 y 8 min) a la membrana PVDF<sup>1</sup>.

1. Membrana de polivinildifluoruro (Immun-Blot® PVDF “membrane for protein blotting” 0,2 µm, BioRad®).

#### **A.1.2- Controles negativos**

Los controles negativos, correspondientes a las muestras A-MEM<sub>5</sub>, A-MEM<sub>60</sub>, A-SLGO<sub>5</sub> y A-SLGO<sub>30</sub>, fueron negativos a la detección de *P. salmonis* mediante la metodología “dot-blot”.

#### **A.1.3- Cinética de infección de *P. salmonis* cepa SLGO-95 en ovas de salmón del Atlántico**

Ninguna de las muestras de ovas de salmón del Atlántico (*S. salar*) desafiadas durante diferentes tiempos con la cepa SLGO-95 (A-SLGO<sub>1</sub>, A-SLGO<sub>3</sub>, A-SLGO<sub>5</sub>, A-SLGO<sub>10</sub>, A-SLGO<sub>30</sub> y A-SLGO<sub>60</sub>) generó puntos de positividad en las tres películas expuestas a la membrana PVDF en los respectivos tiempos de exposición (2, 5 y 8 min).

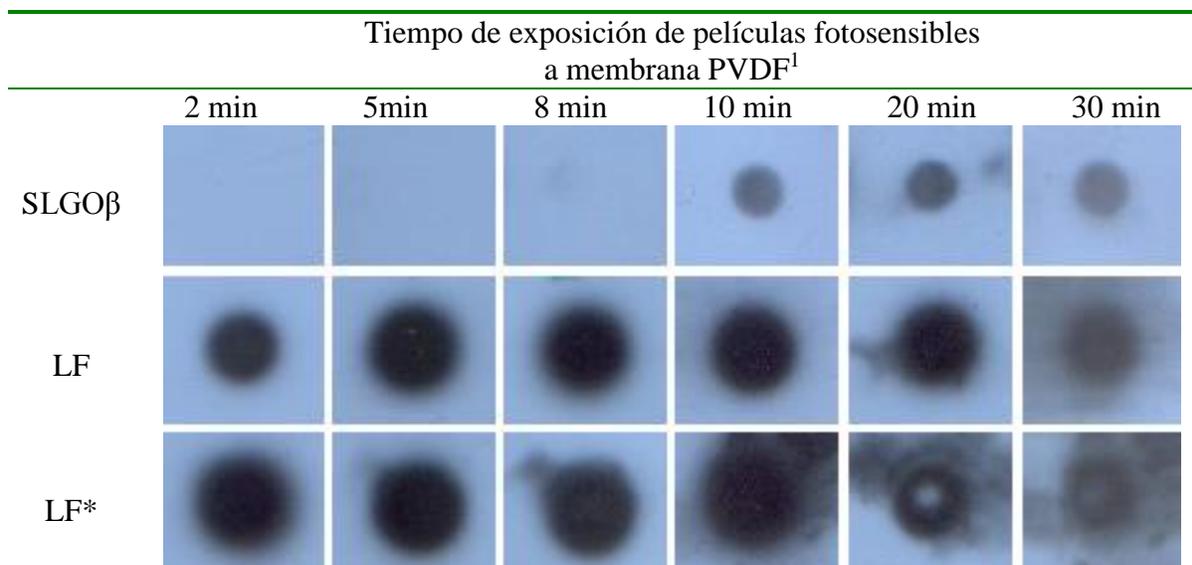
## **A.2- Segunda experiencia**

En esta segunda experiencia, como se describió en el punto A.6.2 de Materiales y Métodos, se buscó detectar la presencia de antígenos bacterianos en muestras de ovas de salmón del Atlántico (*S. salar*) desafiadas con dos cepas de *P. salmonis* (SLGO-95 y LF-89).

### **A.2.1- Controles positivos**

La muestra control positivo SLGO $\beta$  generó positividad en las películas fotosensibles que se expusieron a la membrana PVDF desde los 8 min. La misma muestra no mostró positividad en las películas expuestas en los tiempos menores (2 y 5 min) (figura 6). Con respecto a los controles positivos de la cepa LF-89 (LF y LF\*), éstos generaron puntos de positividad en las seis películas correspondientes a todos los tiempos de exposición: 2, 5, 8, 10, 20 y 30 min (figura 6).

Mediante el estudio por densitometría, el número de píxeles generados por la muestra de la cepa SLGO-95 (SLGO $\beta$ ), a partir de la película expuesta durante 8 min a la membrana PVDF, presentó un aumento a medida que el tiempo de exposición de la película a la membrana fue mayor. En este caso, el mayor número de píxeles se presentó a los 20 min de exposición (28.991), mientras que a los 30 min (28.944 Píxeles) no difirió por mucho de los píxeles generados a los 20 min (tabla 5). En el caso de las muestras de LF-89, LF y LF\*, el mayor número de píxeles se presentó en los tiempos menores de exposición de la película a la membrana. La muestra LF presentó un mayor número de píxeles a los 5 min de exposición (137.640 píxeles), mientras que para la muestra LF\* fue a los 2 min de exposición (173.944 píxeles). En estos casos, desde el momento del “peak” de píxelaje estos disminuyeron a medida que aumentó el tiempo de exposición de la película a la membrana PVDF (tabla 5 y gráfico 4).



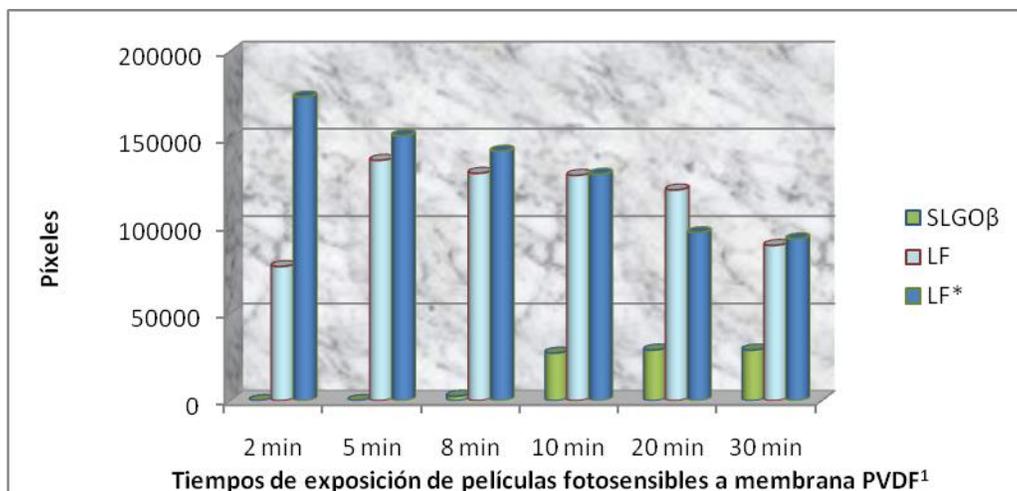
**Figura 6.** Puntos de positividad al “dot-blot” de muestras de sobrenadante de cultivo celular (CHSE-214), infectado con las cepas SLGO-95 (pasaje 10) y LF-89 de *Piscirickettsia salmonis*. Estas muestras corresponden a controles positivos de la infección (SLGO $\beta$ , LF y LF\*) del desafío principal<sup>2</sup> de ovas. SLGO $\beta$  (cepa SLGO-95) genera puntos de positividad en las películas expuestas a la membrana PVDF<sup>1</sup> durante 8<sup>3</sup>, 10, 20 y 30 min respectivamente. Por otra parte, LF (LF-89 usada en el desafío principal de ovas) y LF\* (LF-89 utilizada en desafío de ovas mientras se estandarizó la metodología “dot-blot”) generaron positividad en todas películas expuestas a la membrana PVDF<sup>1</sup> (2, 5, 8, 10, 20 y 30 min).

1. Membrana de polivinildifluoruro (Immun-Blot® PVDF “membrane for protein blotting” 0,2  $\mu$ m, BioRad®).
2. Desafío principal; desafío de ovas de dos especies de salmónidos (salmón del Atlántico y trucha arco iris) con dos cepas de *P. salmonis* (SLGO-95 y LF-89).
3. Ningún contraste computacional de la imagen permitió que el punto de positividad generado por SLGO $\beta$  en la película fotosensible expuesta 8 min a la membrana PVDF fuera visible luego de ser impreso a papel.

**Tabla 5.** Píxeles, calculados mediante densitometría, generados por las muestras control positivo de infección (SLGO-95 y LF-89) en seis películas expuestas durante seis tiempos a la membrana PVDF<sup>1</sup>.

| Muestras sometidas a “dot-blot” | Tiempo de exposición de películas fotosensibles a membrana PVDF <sup>1</sup> |         |         |         |         |        |
|---------------------------------|--|---------|---------|---------|---------|--------|
|                                 | 2 min  | 5 min   | 8 min   | 10 min  | 20 min  | 30 min |
| SLGO $\beta$ <sup>2</sup>       | 0  | 0       | 2.589   | 27.248  | 28.991  | 28.944 |
| LF <sup>3</sup>                 | 76.789   | 137.640 | 130.201 | 129.006 | 120.643 | 88.892 |
| LF* <sup>4</sup>                | 173.944  | 151.738 | 142.864 | 129.655 | 96.215  | 92.665 |

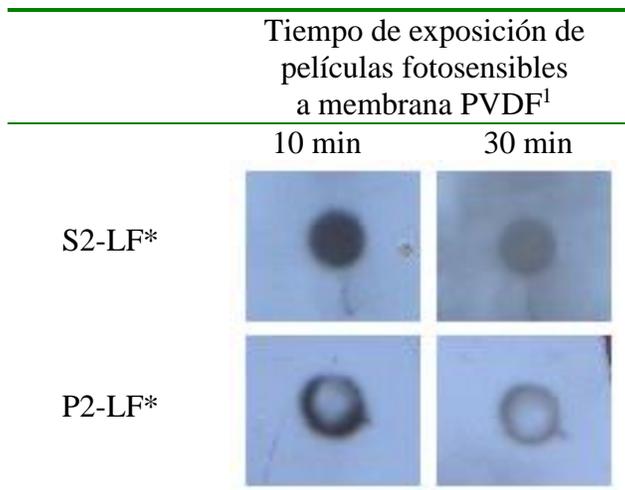
1. Membrana de polivinildifluoruro (Immun-Blot® PVDF “membrane for protein blotting” 0,2  $\mu$ m, BioRad®).
2. Cepa SLGO-95 usada en el desafío principal de ovas de especies salmonídeas.
3. Cepa LF-89 usada en el desafío principal de ovas de especies salmonídeas.
4. Cepa LF-89 usada en una memoria de título anterior, la cuál tiene una probada positividad a la metodología “dot-blot” para la detección de *Piscirickettsia salmonis*.



**Gráfico 4.** Píxeles generados por las muestras control positivo de infección (SLGOβ<sup>2</sup>, LF<sup>3</sup> y LF\*<sup>4</sup>) en seis películas expuestas durante seis tiempos a la membrana PVDF<sup>1</sup>.

1. Membrana de polivinildifluoruro (Immun-Blot® PVDF “membrane for protein blotting” 0,2 μm, BioRad®).
2. Cepa SLGO-95 usada en el desafío principal de ovas de especies salmonídeas.
3. Cepa LF-89 usada en el desafío principal de ovas de especies salmonídeas.
4. Cepa LF-89 usada en una memoria de título anterior, la cuál tiene una probada positividad a la metodología “dot-blot” para la detección de *Piscirickettsia salmonis*.

Las muestras S2-LF\* y P2-LF\* generaron puntos de positividad en las dos películas, expuestas 10 y 30 min respectivamente (figura 7).



**Figura 7.** Puntos de positividad al “dot-blot” de muestras correspondientes a las fracciones resultantes de la centrifugación a 11.427 x g de una alícuota de la muestra LF\*<sup>2</sup>. La primera fila corresponde a los puntos de positividad generados por la fracción sobrenadante (S2) de la muestra LF\* (S2-LF\*), durante dos tiempos de exposición de la película fotosensible a la membrana PVDF<sup>1</sup> (10 y 30 min). La segunda fila corresponde a los puntos de positividad generados por la fracción precipitada (P2) de la muestra LF\* (P2-LF\*), durante los mismos dos tiempos de exposición que la muestra S2-LF\*.

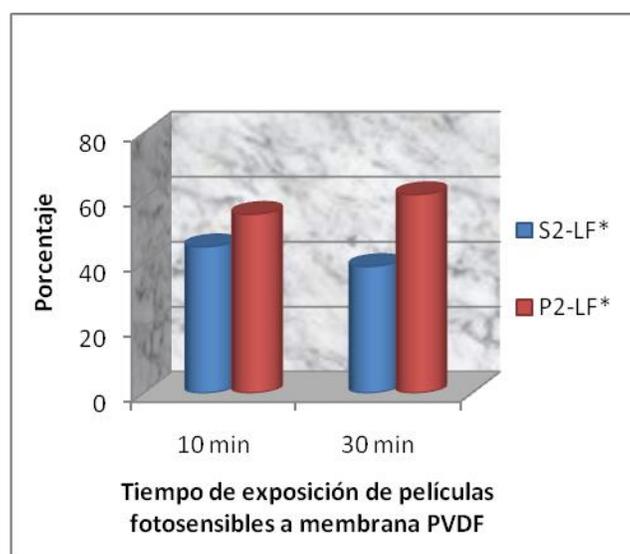
1. Membrana de polivinildifluoruro (Immun-Blot® PVDF “membrane for protein blotting” 0,2 μm, BioRad®).
2. Sobrenadante de cultivo celular (CHSE-214) infectado con la cepa LF-89 de *Piscirickettsia salmonis*.

En la película expuesta 10 min a la membrana PVDF, la muestra S2-LF\* generó 37.855 píxeles, mientras que la muestra P2-LF\* alcanzó los 46.259 (tabla 6). Por otra parte, en la película expuesta 30 min la muestra S2-LF\* generó 15.176 píxeles y la muestra P2-LF\* 23.786 píxeles (tabla 6). En la tabla 6 se establece una relación de porcentaje entre muestras S2 y P2 dentro de una misma película, donde el 100% sería la suma total de ambos píxelajes. En el gráfico 5 se muestra la relación de porcentaje entre ambas muestras obtenidas en dos películas expuestas durante distintos tiempos (10 y 30 min), mientras en el gráfico 6 se visualiza la misma relación en base al número de píxeles generados.

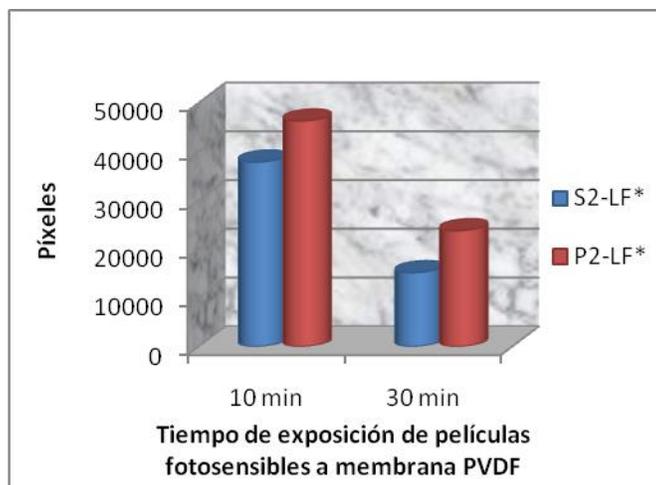
**Tabla 6.** Píxeles, calculados mediante densitometría, generados por las muestras S2-LF\*<sup>1</sup> y P2-LF\*<sup>2</sup> en dos películas. Relación en porcentaje de la suma de píxeles de ambas muestras sobre una misma película.

| Muestras sometidas a “dot-blot” | Tiempo de exposición de películas fotosensibles a membrana PVDF <sup>3</sup> |            |         |            |
|---------------------------------|--|------------|---------|------------|
|                                 | 10 min   |            | 30 min  |            |
|                                 | Píxeles  | Porcentaje | Píxeles | Porcentaje |
| S2-LF* <sup>1</sup>             | 37.855   | 45         | 15.176  | 39         |
| P2-LF* <sup>2</sup>             | 46.259   | 55         | 23.786  | 61         |

1. Fracción sobrenadante (S2) de la centrifugación a 11.427 x g de la cepa LF-89.
2. Fracción precipitada (P2) de la centrifugación a 11.427 x g de la cepa LF-89.
3. Membrana de polivinildifluoruro (Inmun-Blot® PVDF “membrane for protein blotting” 0,2 µm, BioRad®).

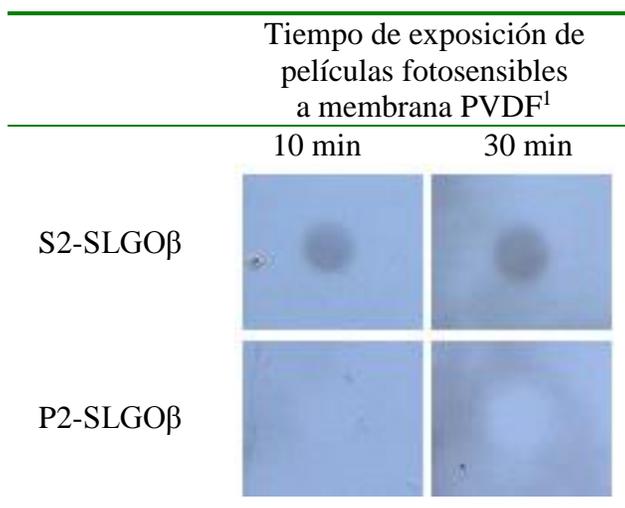


**Gráfico 5.** Porcentaje en relación a la suma de píxeles entre las muestras S2-LF\* y P2-LF\* generadas en dos tiempos de exposición de película a membrana de polivinildifluoruro (PVDF) (10 y 30 min).



**Gráfico 6.** Píxeles generados por las muestras S2-LF\* y P2-LF\* durante dos tiempos de exposición de película a membrana de polivinildifluoruro (PVDF) (10 y 30 min).

La muestra S2-SLGO $\beta$  (figura 8) generó un punto de positividad en las dos películas expuestas cada una 10 y 30 min respectivamente. La muestra de P2-SLGO $\beta$  no generó punto de positividad en ninguna de las dos películas reveladas en los tiempos de exposición 10 y 30 min (figura 8).



**Figura 8.** Puntos de positividad al “dot-blot” de muestras correspondientes a la centrifugación a 11.427 x g de una alícuota de la cepa SLGO-95 de *Piscirickettsia salmonis*. La primera fila corresponde a los puntos de positividad generados por la fracción sobrenadante (S2) de la muestra SLGO $\beta$ <sup>2</sup> (S2-SLGO $\beta$ ) durante dos tiempos de exposición de la película fotosensible a la membrana PVDF<sup>1</sup> (10 y 30 min). La segunda fila corresponde a la zona de la película que no generó positividad a partir de la fracción precipitada (P2) de la muestra SLGO $\beta$  (P2-SLGO $\beta$ ) durante los mismos dos tiempos de exposición.

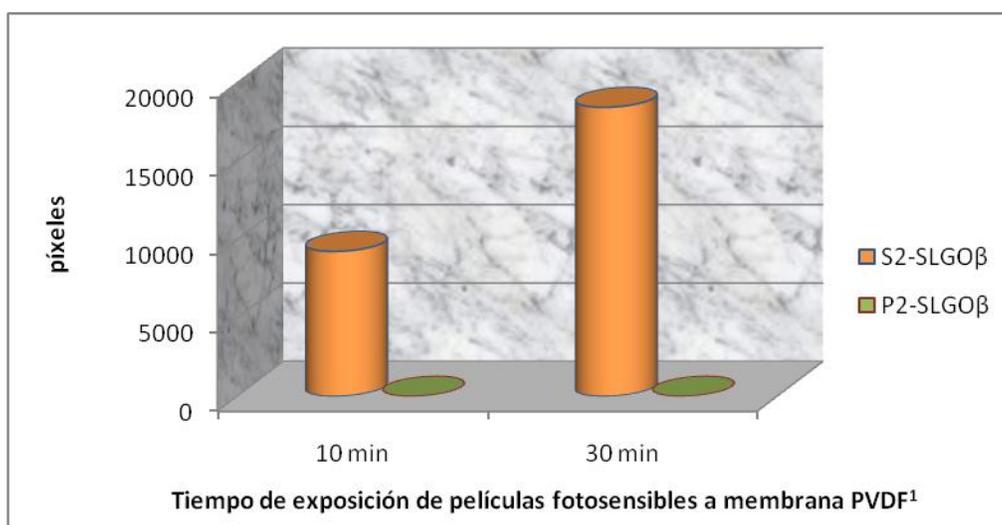
1. Membrana de polivinildifluoruro (Immun-Blot® PVDF “membrane for protein blotting” 0,2  $\mu$ m, BioRad®).
2. Sobrenadante de cultivo celular (CHSE-214) infectado con la cepa SLGO-95 de *Piscirickettsia salmonis*, usada en el desafío principal de ovas de especies salmonídeas.

En la película expuesta 10 min a la membrana PVDF, la muestra S2-SLGO $\beta$  generó 9.249 píxeles, mientras que la muestra P2-SLGO $\beta$  no generó positividad (tabla 7). Por otra parte, en la película expuesta 30 min la muestra S2-SLGO $\beta$  generó 18.439 píxeles y la muestra P2-SLGO $\beta$  nuevamente no generó positividad (tabla 7 y gráfico 7).

**Tabla 7.** Píxeles, calculados mediante densitometría, obtenidos por las muestras S2-SLGO $\beta$ <sup>1</sup> y P2-SLGO $\beta$ <sup>2</sup>.

| Muestras sometidas a “dot-blot” | Tiempo de exposición de películas fotosensibles a membrana PVDF <sup>1</sup> |        |
|---------------------------------|--|--------|
|                                 | 10 min   | 30 min |
| S2-SLGO $\beta$ <sup>1</sup>    | 9.2489   | 18.439 |
| P2-SLGO $\beta$ <sup>2</sup>    | 0  | 0      |

1. Fracción sobrenadante (S2) de la centrifugación a 11.427 x g de SLGO $\beta$ <sup>4</sup>.
2. Fracción precipitada (P2) de la centrifugación a 11.427 x g de SLGO $\beta$ <sup>4</sup>.
3. Membrana de polivinildifluoruro (Immun-Blot® PVDF “membrane for protein blotting” 0,2  $\mu$ m, BioRad®).
4. Sobrenadante de cultivo celular (CHSE-214) infectado con la cepa SLGO-95 de *Piscirickettsia salmonis*, usada en el desafío principal de ovas de especies salmonídeas.



**Gráfico 7.** Píxeles generados por las muestras S2-SLGO $\beta$ <sup>2</sup> y P2-SLGO $\beta$ <sup>3</sup> en dos tiempos de exposición de membrana a membrana PVDF<sup>1</sup> (10 y 30 min).

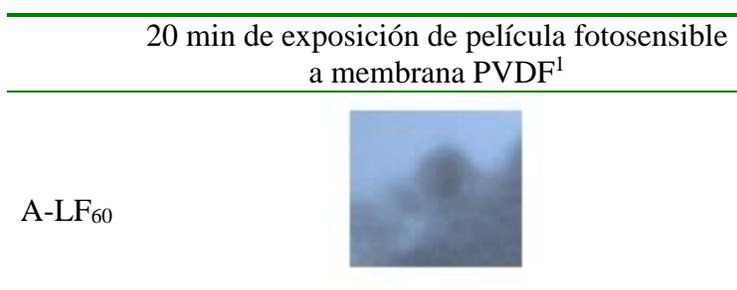
1. Membrana de polivinildifluoruro (Immun-Blot® PVDF “membrane for protein blotting” 0,2  $\mu$ m, BioRad®).
2. Fracción sobrenadante (S2) de la centrifugación a 11.427 x g de SLGO $\beta$ <sup>4</sup>.
3. Fracción precipitada (P2) de la centrifugación a 11.427 x g de SLGO $\beta$ <sup>4</sup>.
4. Sobrenadante de cultivo celular (CHSE-214) infectado con la cepa SLGO-95 de *Piscirickettsia salmonis*, usada en el desafío principal de ovas de especies salmonídeas.

### **A.2.2- Controles negativos**

Los controles negativos, correspondientes a las muestras A-SLGO<sub>m5</sub>, A-SLGO<sub>m30</sub>, A-MEM<sub>5</sub>, A-MEM<sub>60</sub>, A-LF<sub>m5</sub> y A-LF<sub>m30</sub>, también fueron expuestas a la película fotosensible en los tiempos 2, 5, 8 y 20 min. Todos estos controles fueron negativos a la detección de *P. salmonis* mediante la metodología “dot-blot”.

### A.2.3- Cinética de infección de dos cepas de *P. salmonis* en ovas de salmón del Atlántico

Las muestras ovas de salmón del Atlántico (*S. salar*), procesadas como se señala en el punto A.4 de Materiales y Métodos, desafiadas con la cepa SLGO-95 durante todos los tiempos de la cinética (A-SLGO<sub>1</sub>, A-SLGO<sub>3</sub>, A-SLGO<sub>5</sub>, A-SLGO<sub>10</sub>, A-SLGO<sub>30</sub> y A-SLGO<sub>60</sub>) no generaron puntos de positividad en ninguna de las cuatro películas fotosensibles expuestas durante los cuatro tiempos de exposición a la membrana PVDF (2, 5, 8 y 20 min). En relación a las muestras de ovas de salmón Atlántico (*S. salar*) desafiadas con la cepa LF-89, la cinética de infección demostró negatividad entre los tiempos de 1 a 30 min (A-LF<sub>1</sub>, A-LF<sub>3</sub>, A-LF<sub>5</sub>, A-LF<sub>10</sub> y A-LF<sub>30</sub>), independiente del tiempo de exposición de la película fotosensible (2, 5, 8 y 20 min). En el caso de la muestra expuesta durante 60 min (A-LF<sub>60</sub>), esta generó un punto de positividad sólo en la película que fue expuesta a la membrana PVDF durante 20 min (Figura 9).



**Figura 9.** La imagen muestra el punto de positividad generado al “dot-blot” por la muestra de ova de salmón del Atlántico (*Salmo salar*) desafiada a la cepa LF-89 de *Piscirickettsia salmonis* durante 60 min (A-LF<sub>60</sub>). Se observa además, un “background” generado en la película expuesta durante 20 min a la quimioluminiscencia.

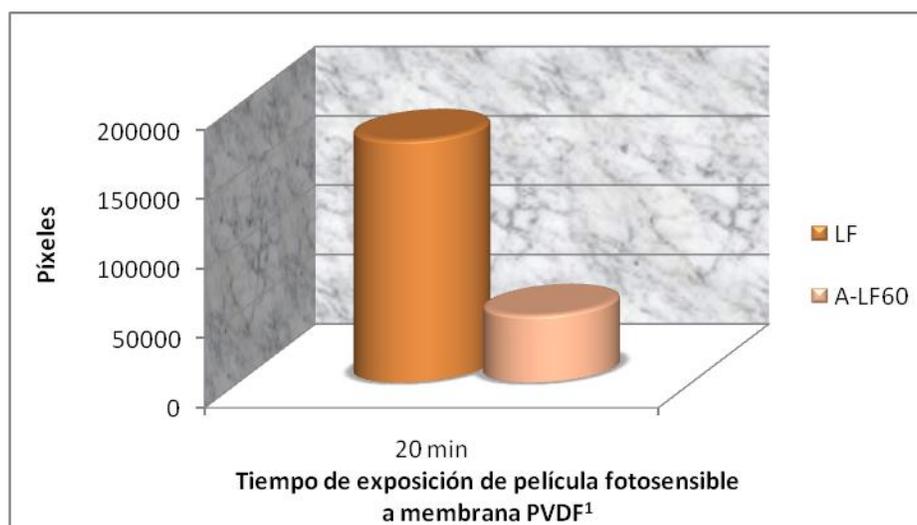
1. Membrana de polivinildifluoruro (Immun-Blot® PVDF “membrane for protein blotting” 0,2 µm, BioRad®).

Con respecto a la medición de píxeles, el punto generado por la muestra expuesta durante 60 min (A-LF<sub>60</sub>) correspondió al 27% respecto al pixelaje, en la misma película, de la muestra de la bacteria total (LF) usada como desafío de ovas de salmón del Atlántico (*S. salar*). Detalle del número de píxeles del punto de positividad se muestra en la tabla 8 y se visualiza en el gráfico 8.

**Tabla 8.** Pixelaje, calculados mediante densitometría, de los puntos generados por las muestras A-LF<sub>60</sub><sup>1</sup> y LF<sup>2</sup>, en la película expuesta durante 20 min a la membrana PVDF<sup>3</sup>. Porcentaje de A-LF<sub>60</sub><sup>1</sup> respecto la muestra de desafío (LF<sup>2</sup>).

| Muestras sometidas a “dot-blot” | 20 min de exposición de película fotosensible a membrana PVDF <sup>3</sup> |            |
|---------------------------------|--|------------|
|                                 | Píxeles  | Porcentaje |
| LF <sup>2</sup>                 | 174.551  | 100        |
| A-LF <sub>60</sub> <sup>1</sup> | 48.364   | 27,7       |

1. Muestra de ova de salmón del Atlántico (*Salmo salar*) desafiada durante 60 min con LF-89.
2. Muestra de LF-89 usada como desafío de ovas de salmón del Atlántico (*Salmo salar*) en desafío principal.
3. Membrana de polivinildifluoruro (Inmun-Blot® PVDF “membrane for protein blotting” 0,2 µm, BioRad®).



**Gráfico 8.** Pixelaje de los puntos generados por las muestras A-LF<sub>60</sub><sup>2</sup> y LF<sup>3</sup>, en la película expuesta durante 20 min a la membrana PVDF<sup>1</sup>.

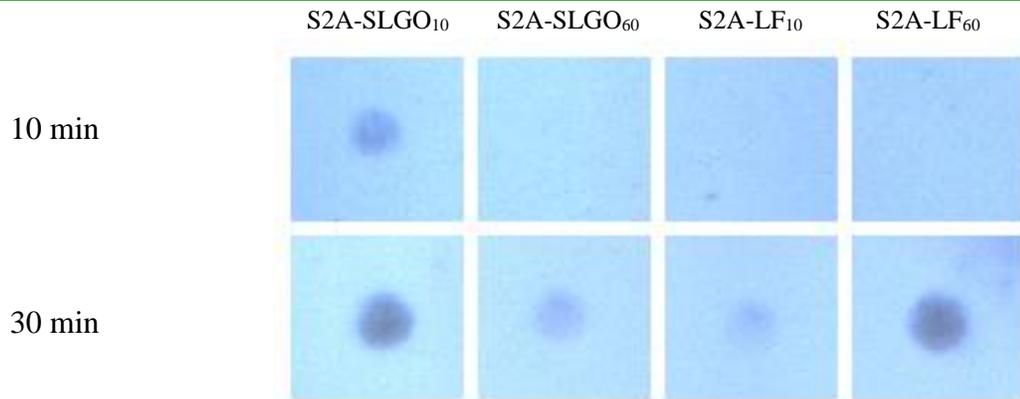
1. Membrana de polivinildifluoruro (Inmun-Blot® PVDF “membrane for protein blotting” 0,2 µm, BioRad®).
2. Muestra de ova de salmón del Atlántico desafiada durante 60 min con LF-89.
3. Muestra de LF-89 usada como desafío de ovas de salmón del Atlántico (*Salmo salar*) en desafío principal.

Los sobrenadantes (S2) de los homogeneizado de dos ovas, expuestas a SLGO-95, denominadas S2A-SLGO<sub>10</sub> y S2A-SLGO<sub>60</sub>, y otra a la cepa LF-89, denominada S2A-LF<sub>60</sub>, sólo mostraron positividad cuando la película fotosensible fue expuesta durante 30 min. Por otra parte, la muestra S2A-LF<sub>10</sub> (ova de salmón del Atlántico desafiada durante 10 min con la cepa LF-89) generó positividad en ambas películas (10 y 30 min de exposición a la membrana PVDF) (figura 10).

---

Tiempo de exposición de  
películas fotosensibles a  
membrana PVDF

---



---

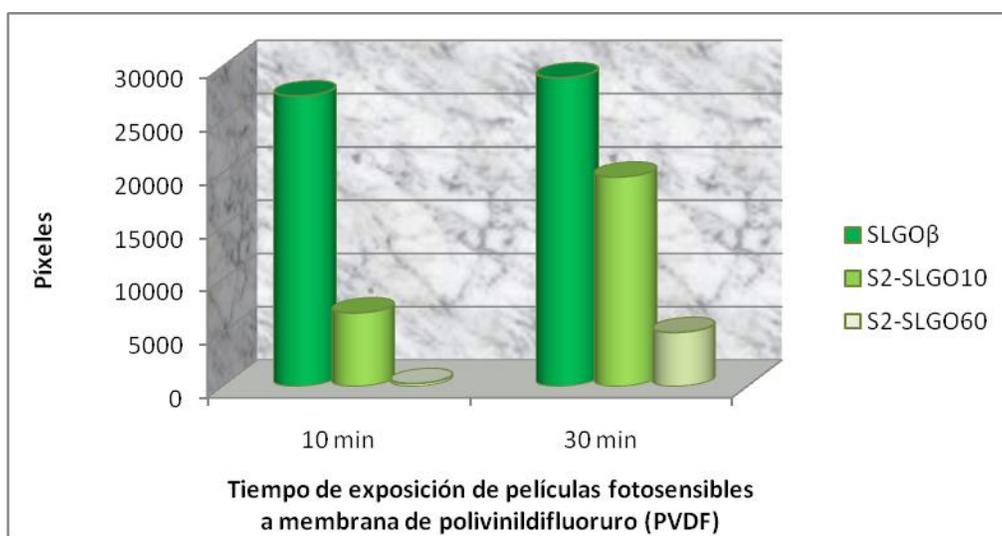
**Figura 10.** Puntos de positividad al “dot-blot” generados por las muestras S2 (fracciones sobrenadantes) producto de la centrifugación a 11.427 x g de cuatro ovas de salmón del Atlántico (*Salmo salar*) desafiadas con SLGO-95 y LF-89 (A-SLGO<sub>10</sub>, A-SLGO<sub>60</sub>, A-LF<sub>10</sub> y A-LF<sub>60</sub>), en dos películas expuestas 10 y 30 min a la membrana polivinildifluoruro (PVDF). A esta imagen se aumentó el contraste computacionalmente en un 40 % para visualizar mejor los puntos de positividad.

Los píxeles obtenidos por medición de densitometría de los puntos generados por las muestras S2A-SLGO<sub>10</sub> y S2A-SLGO<sub>60</sub> se compararon porcentualmente entre sí a partir de un 100% representado por la muestra SLGO $\beta$ , correspondiente a la cepa SLGO-95 usada como desafío de las ovas originarias de las muestras ya nombradas. En el caso de la película expuesta 10 min a la membrana PVDF, la muestra S2A-SLGO<sub>10</sub> correspondió al 25,3% del número de píxeles generados por la muestra SLGO $\beta$ , mientras que la muestra S2A-SLGO<sub>60</sub> no generó positividad al “dot-blot”. En el caso de la película expuesta 30 min, la muestra S2A-SLGO<sub>10</sub> generó píxeles que representaron el 67,8% y la muestra S2A-SLGO<sub>60</sub> 17,5% (tabla 9 y gráfico 9).

**Tabla 9.** Píxeles y porcentaje, respecto del control positivo (SLGO $\beta^1$ ), de las muestras S2A-SLGO $_{10}^2$  y S2A-SLGO $_{60}^3$ .

| Muestras sometidas a “dot-blot” | Tiempo de exposición de películas fotosensibles a membrana PVDF <sup>4</sup> |            |         |            |
|---------------------------------|--|------------|---------|------------|
|                                 | 10 min   |            | 30 min  |            |
|                                 | Píxeles  | Porcentaje | Píxeles | Porcentaje |
| SLGO $\beta^1$                  | 27.248   | 100        | 28.944  | 100        |
| S2A-SLGO $_{10}^2$              | 6.891  | 25,3       | 19.637  | 67,8       |
| S2A-SLGO $_{60}^3$              | -  | -          | 5.059   | 17,5       |

1. Cepa SLGO-95 usada como desafío de ovas de salmón del Atlántico (*Salmo salar*) en desafío principal.
2. Fracción sobrenadante (S2) de la centrifugación a 11.427 x g de ova de salmón del Atlántico (*S. salar*) desafiada durante 10 min con la cepa SLGO-95.
3. Fracción sobrenadante (S2) de la centrifugación a 11.427 x g de ova de salmón del Atlántico (*S. salar*) desafiada durante 60 min con la cepa SLGO-95.
4. Membrana de polivinildifluoruro (Inmun-Blot<sup>®</sup> PVDF “membrane for protein blotting” 0,2  $\mu$ m, BioRad<sup>®</sup>).



**Gráfico 9.** Píxeles, respecto del control positivo (SLGO $\beta^1$ ), de las muestras S2A-SLGO $_{10}^2$  y S2A-SLGO $_{60}^3$ .

1. Cepa SLGO-95 usada como desafío de ovas de salmón del Atlántico (*Salmo salar*) en desafío principal.
2. Fracción sobrenadante (S2) de la centrifugación a 11.427 x g de ova de salmón del Atlántico (*S. salar*) desafiada durante 10 min con la cepa SLGO-95.
3. Fracción sobrenadante (S2) de la centrifugación a 11.427 x g de ova de salmón del Atlántico (*S. salar*) desafiada durante 60 min con la cepa SLGO-95.

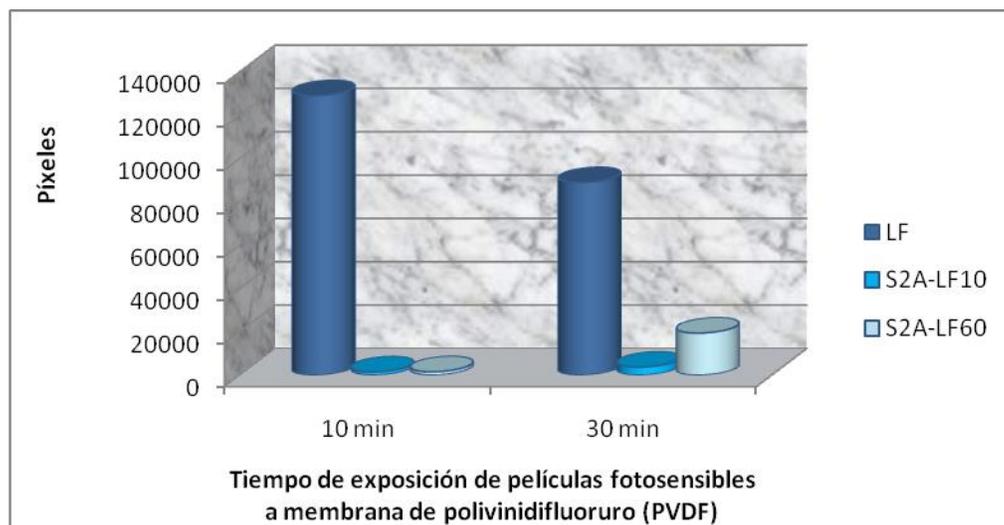
En el caso del número de píxeles de los puntos generados por las muestras S2A-LF $_{10}$  y S2A-LF $_{60}$  también se compararon porcentualmente respecto de un 100% representado por la muestra LF, correspondiente a la cepa LF-89 usada como desafío de las mismas ovas. En el caso de la película expuesta 10 min a la membrana PVDF, las muestras S2A-LF $_{10}$  (S2 de ova de salmón del Atlántico desafiada durante 10 min con LF-89) y S2A-LF $_{60}$  (S2 de ova de la misma especie desafiada durante 60 min con LF-89) no generaron pixelaje (tabla 10). En el caso de la película expuesta 30 min, la muestra S2A-LF $_{10}$  generó

píxeles que representaron el 4,2% y la muestra S2A-LF<sub>60</sub> 21,8%, ambas respecto de los píxeles generados por el control positivo LF (tabla 10 y gráfico 10).

**Tabla 10.** Píxeles y porcentaje, respecto del control positivo (LF<sup>1</sup>), de S2A-LF<sub>10</sub><sup>2</sup> y S2A-LF<sub>60</sub><sup>3</sup>.

| Muestras sometidas a “dot-blot”   | Tiempo de exposición de películas fotosensibles a membrana PVDF <sup>1</sup> |            |         |            |
|-----------------------------------|--|------------|---------|------------|
|                                   | 10 min   |            | 30 min  |            |
|                                   | Píxeles  | Porcentaje | Píxeles | Porcentaje |
| LF <sup>1</sup>                   | 129.006  | 100        | 88.892  | 100        |
| S2A-LF <sub>10</sub> <sup>2</sup> | -  | -          | 3.706   | 4,2        |
| S2A-LF <sub>60</sub> <sup>3</sup> | -  | -          | 19.416  | 21,8       |

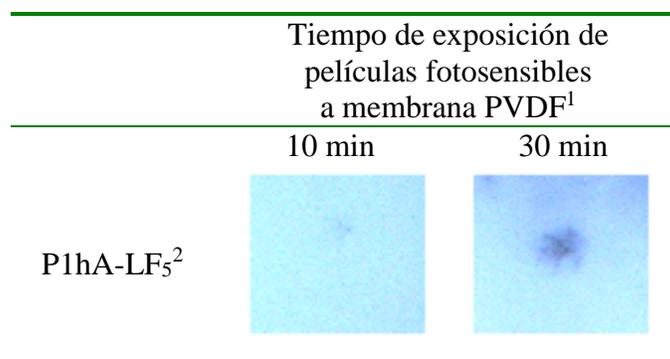
1. Cepa LF-89 usada como desafío de ovas de salmón del Atlántico (*Salmo salar*) en desafío principal.
2. Fracción sobrenadante (S2) de la centrifugación a 11.427 x g de ova de salmón del Atlántico (*S. salar*) desafiada durante 10 min con la cepa LF-89.
3. Fracción sobrenadante (S2) de la centrifugación a 11.427 x g de ova de salmón del Atlántico (*S. salar*) desafiada durante 60 min con la cepa LF-89.
4. Membrana de polivinildifluoruro (Inmun-Blot® PVDF “membrane for protein blotting” 0,2 µm, BioRad®).



**Gráfico 10.** Número de píxeles, respecto del control positivo (LF<sup>1</sup>), de las muestras S2A-LF<sub>10</sub><sup>2</sup> y S2A-LF<sub>60</sub><sup>3</sup>.

1. Cepa LF-89 usada como desafío de ovas de salmón del Atlántico (*Salmo salar*) en desafío principal.
2. Fracción sobrenadante (S2) de la centrifugación a 11.427 x g de ova de salmón del Atlántico (*S. salar*) desafiada durante 10 min con la cepa LF-89.
3. Fracción sobrenadante (S2) de la centrifugación a 11.427 x g de ova de salmón del Atlántico (*S. salar*) desafiada durante 60 min con la cepa LF-89.

Las muestras P1A-SLGO<sub>5</sub>, P1A-LF<sub>5</sub> y P1hA-SLGO<sub>5</sub> no generaron puntos de positividad en ninguna de las dos películas expuestas a la membrana PVDF (10 y 30 min). La muestra P1hA-LF<sub>5</sub> logró generar un punto de positividad sólo en la película expuesta 30 min a la membrana PVDF (figura 11).



**Figura 11.** Punto de positividad al “dot-blot” generado por la muestra P1hA-LF<sub>5</sub><sup>2</sup>. Este punto sólo se presentó en la película expuesta durante 30 min a la membrana PVDF<sup>1</sup>.

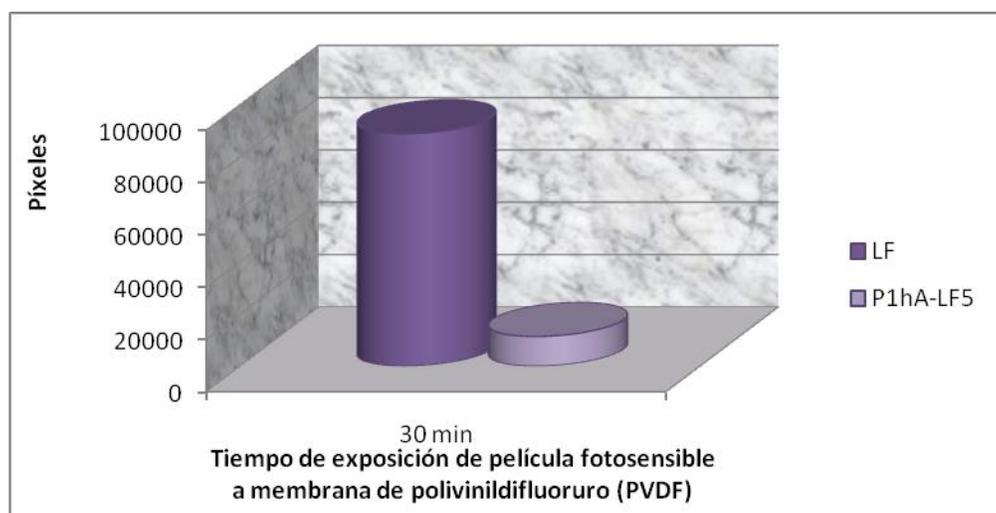
1. Membrana de polivinildifluoruro (Immun-Blot® PVDF “membrane for protein blotting” 0,2 µm, BioRad®).
2. Fracción precipitada (P1), hervido durante 5 min, de la centrifugación a 1.208 x g de una muestra de ova de salmón del Atlántico (*Salmo salar*) desafiada durante 5 min con LF-89.

El valor de los píxeles de la muestra LF se tomó como 100% para la determinación del porcentaje de estructuras bacterianas que se pudieron encontrar en la fracción P1 hervida (P1h) producto de la centrifugación a 1.208 x g del homogeneizado de una ova de salmón del Atlántico (*S. salar*) desafiada durante 5min con la cepa LF-89 (A-LF<sub>5</sub>). Sólo en la película expuesta 30 min la muestra P1hA-LF<sub>5</sub> generó positividad, la cuál correspondió al 12,8% del número de píxeles alcanzado por la muestra LF (control positivo) en la misma película (tabla 11 y grafico 11).

**Tabla 11.** Píxeles y porcentaje, respecto al control positivo (LF<sup>1</sup>), de la muestra P1hA-LF<sub>5</sub><sup>2</sup>.

| Muestras sometidas a “dot-blot”   | Tiempo de exposición de película fotosensible a membrana PVDF <sup>3</sup> |            |
|-----------------------------------|--|------------|
|                                   | 30 min   |            |
|                                   | Píxeles  | Porcentaje |
| LF <sup>1</sup>                   | 88.892   | 100        |
| P1hA-LF <sub>5</sub> <sup>2</sup> | 11.348   | 12,8       |

1. Cepa LF-89 usada como desafío de ovas de salmón del Atlántico (*Salmo salar*) en desafío principal.
2. Fracción precipitada (P1), hervida durante 5 min, de la centrifugación a 1.208 x g de una muestra de ova de salmón del Atlántico (*Salmo salar*) desafiada durante 5 min con LF-89.
3. Membrana de polivinildifluoruro (Immun-Blot® PVDF “membrane for protein blotting” 0,2 µm, BioRad®).



**Gráfico 11.** Número de píxeles, respecto al control positivo (LF<sup>2</sup>), generados por la muestra P1hA-LF<sub>5</sub><sup>3</sup>.

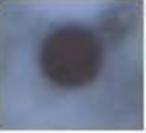
1. Membrana polivinildifluoruro (PVDF).
2. Cepa LF-89 usada como desafío de ovas de salmón del Atlántico (*Salmo salar*).
3. Fracción precipitado (P1), hervido durante 5 min, de la centrifugación a 1.208 x g de una muestra de ova de salmón del Atlántico (*Salmo salar*) desafiada durante 5 min con LF-89.

### **A.3- Tercera experiencia**

En esta tercera experiencia, como se mostró en el punto A.6.3 de Materiales y Métodos, se buscó detectar la presencia de antígenos bacterianos en muestras de ovas de trucha arco iris (*O. mykiss*) desafiadas durante el desafío principal con dos cepas de *P. salmonis* (SLGO-95 y LF-89).

#### **A.3.1- Controles positivos**

Los controles positivos, tanto SLGO-95 (SLGOβ) como LF-89 (LF), generaron positividad a la detección de *P. salmonis* en todos los volúmenes cargados (30 y 15 μL). Ambas cepas generaron puntos de positividad en las dos películas expuestas a la membrana PVDF (20 y 30 min), ver figura 12.

| Tiempo de exposición de películas fotosensibles a membrana PVDF <sup>1</sup> | LF-89   |  | SLGO-95   |   |
|--|---|--|---|---|
|  | 30 µL   | 15 µL  | 30 µL   | 15 µL   |
| 20 min   |  |  |  |  |
| 30 min   |  |  |  |  |

**Figura 12.** Puntos de positividad al “dot-blot” de las muestras controles positivos de la tercera experiencia<sup>2</sup>, cargados cada uno en dos volúmenes (30 y 15 µL) y donde la membrana PVDF<sup>1</sup> fue expuesta en dos tiempos distintos a la película fotosensible (20 y 30 min). Ambas cepas de *Piscirickettsia salmonis* corresponden a “pools” bacterianos pertenecientes a las mismas botellas de cultivo celular usadas en la segunda experiencia<sup>3</sup> (desafío principal<sup>4</sup>).

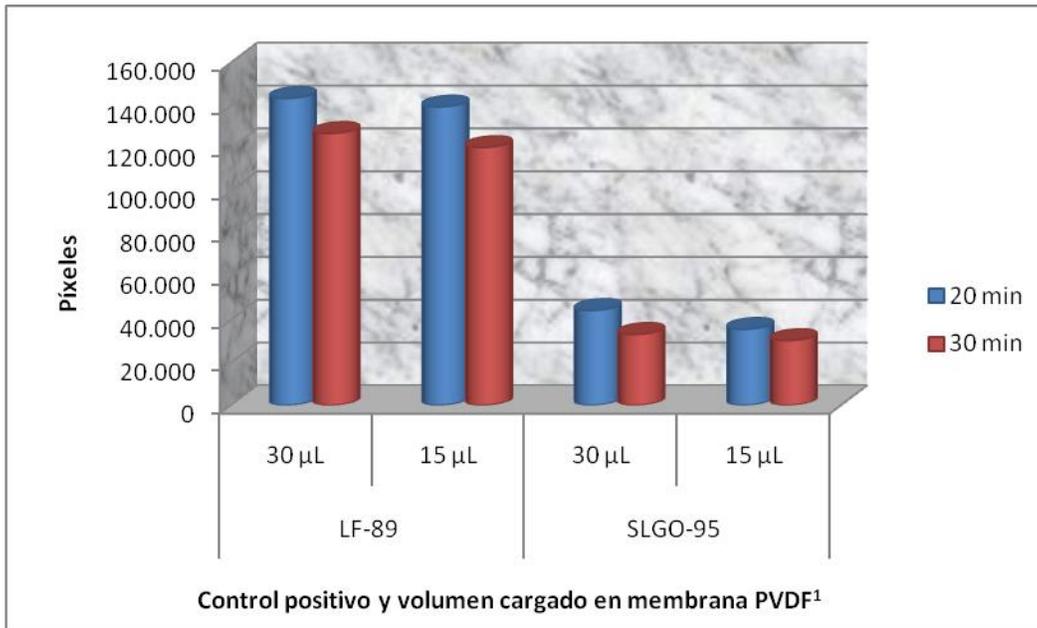
1. Membrana de polivinildifluoruro (Inmun-Blot® PVDF “membrane for protein blotting” 0,2 µm, BioRad®).
2. Tercera experiencia; “dot-blot” realizados a muestras de ovas de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) expuestas a *P. salmonis* durante el desafío principal<sup>4</sup>.
3. Segunda experiencia; “dot-blot” realizados a muestras de ovas de salmón del Atlántico (*Salmo salar*) expuestas a *P. salmonis* durante el desafío principal<sup>4</sup>.
4. Desafío principal; Infección experimental de ovas de dos especies salmonídeas (salmón del Atlántico y trucha arco iris) con dos cepas de *P. salmonis* (SLGO-95 y LF-89).

A simple vista no es posible apreciar una diferencia entre la intensidad de los puntos generados por un misma muestra en los dos volúmenes distintos de carga (30 y 15 µL). El valor de los píxeles totales que se encontró en cada punto de positividad se detalla a continuación en la tabla 12 y el gráfico 12.

**Tabla 12.** Píxeles, calculados mediante densitometría, generados por los controles positivos usados en la tercera experiencia<sup>1</sup>.

| Tiempo de exposición de películas fotosensibles a membrana PVDF <sup>2</sup> | LF-89 <sup>3</sup> |         | SLGO-95 <sup>4</sup> |        |
|--|--------------------|---------|----------------------|--------|
|  | 30 µL              | 15 µL   | 30 µL                | 15 µL  |
| 20 min   | 143.224            | 139.248 | 44.318               | 35.515 |
| 30 min   | 126.905            | 120.313 | 33.144               | 30.243 |

1. Tercera experiencia; “dot-blot” realizados a muestras de ovas de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) expuestas a *P. salmonis*.
2. Membrana de polivinildifluoruro (Inmun-Blot® PVDF “membrane for protein blotting” 0,2 µm, BioRad®).
3. Cepa LF-89 usada como desafío de ovas de dos especies salmonídeas (control positivo).
4. Cepa SLGO-95 usada como desafío de ovas de dos especies salmonídeas (control positivo).



**Gráfico 12.** Número de píxeles de las muestras de SLGO-95 y LF-89 usadas como controles positivos en la tercera experiencia.

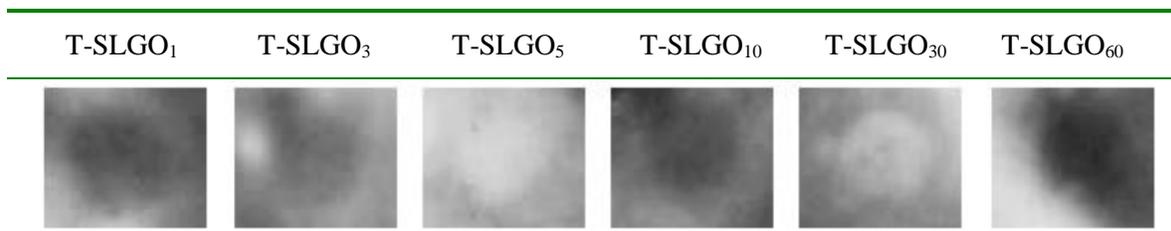
1. Membrana de polivinildifluoruro (Immun-Blot® PVDF “membrane for protein blotting” 0,2 µm, BioRad®).

### **A.3.2- Controles negativos**

Las muestras usadas como controles negativos para la metodología “dot-blot” (T-SLGO<sub>m5</sub>, T-SLGO<sub>m30</sub>, T-MEM<sub>5</sub>, T-MEM<sub>60</sub>, T-LF<sub>m5</sub> y T-LF<sub>m60</sub>) fueron negativas. Las fracciones S2 (subproducto del proceso de homogeneizado de cada muestra, figura 1 en Materiales y Métodos) de estas mismas muestras controles negativos (S2T-SLGO<sub>m5</sub>, S2T-SLGO<sub>m30</sub>, S2T-MEM<sub>5</sub>, S2T-MEM<sub>60</sub>, S2T-LF<sub>m5</sub> y S2T-LF<sub>m60</sub>) también fueron negativas a la detección de *P. salmonis*.

### **A.3.3- Cinética de infección de dos cepas *P. salmonis* en ovas de trucha arco iris**

Las muestras finales de ovas de trucha arco iris (*O. mykiss*) desafiadas con la cepa SLGO-95 durante los tiempos 1, 3, 10 y 60 de la cinética (T-SLGO<sub>1</sub>, T-SLGO<sub>3</sub>, T-SLGO<sub>10</sub> y T-SLGO<sub>60</sub>) generaron puntos de positividad en la película fotosensible expuesta durante 20 min a la membrana PVDF (figura 13), mientras que en la película expuesta durante 10 min ninguna muestra generó positividad.

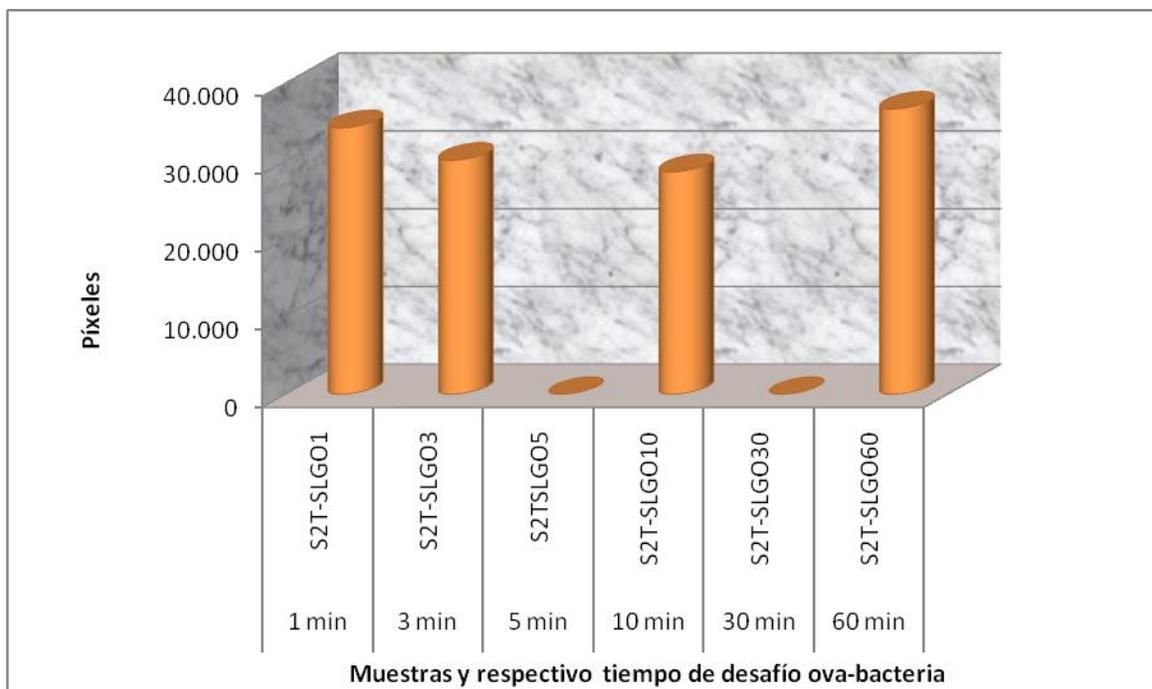


**Figura 13.** Cinética de la infección de *Piscirickettsia salmonis* cepa SLGO-95 en ovas de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*). La película fotosensible fue expuesta a la membrana de polivinildifluoruro (PVDF) durante 20 min.

La densitometría determinó el número de píxeles de cada muestra, lo cuál se detalla en la tabla 13 y en el gráfico 13. La muestra SLGO $\beta$ , alícuota de la suspensión con la cepa SLGO-95 y usada como control positivo del “dot-blot”, se estableció como muestra 100% para poder comparar el porcentaje de estructuras bacterianas presentes en las distintas muestras de ovas de trucha arco iris (*O. mykiss*) desafiadas (tabla 13).

**Tabla 13.** Píxeles, calculados mediante densitometría, de las muestras de ovas de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) infectadas con *Piscirickettsia salmonis* cepa SLGO-95 a distintos tiempos y su relación en porcentaje con la carga inicial. Estos resultados fueron obtenidos a partir de una película fotosensible expuesta 20 min a la membrana polivinildifluoruro (PVDF).

| Muestra              | Píxeles | Porcentaje |
|----------------------|---------|------------|
| SLGO $\beta$         | 44.318  | 100        |
| T-SLGO <sub>1</sub>  | 34.293  | 77,38      |
| T-SLGO <sub>3</sub>  | 30.105  | 67,93      |
| T-SLGO <sub>5</sub>  | 0       | 0          |
| T-SLGO <sub>10</sub> | 28.634  | 64,61      |
| T-SLGO <sub>30</sub> | 0       | 0          |
| T-SLGO <sub>60</sub> | 36.700  | 82,81      |



**Gráfico 13.** Cinética de infección de la cepa SLGO-95 de *Piscirickettsia salmonis* sobre ovas de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*). Píxeles obtenidos mediante densitometría en relación con el tiempo de exposición de las ovas a la suspensión bacteriana.

En relación con las muestras de ovas de trucha arco iris (*O. mykiss*) desafiadas con la cepa LF-89, fueron todas negativas a la presencia de antígenos bacterianos (T-LF<sub>1</sub>, T-LF<sub>3</sub>, T-LF<sub>5</sub>, T-LF<sub>10</sub>, T-LF<sub>30</sub> y T-LF<sub>60</sub>) en ambas películas fotosensibles, expuestas 10 y 20 min a la membrana PVDF.

Basándose en lo observado en la segunda experiencia (A.2 de Resultados), respecto al “dot-blot” realizado a las fracciones sobrenadantes (S2) o subproductos del proceso de obtención de muestra final<sup>1</sup> (figura 1, Materiales y Métodos), se guardó la totalidad de las muestras S2 provenientes de las muestras de ovas de trucha arco iris (*O. mykiss*) teóricamente infectadas con ambas cepas, seis desafiadas con LF-89 y otras seis desafiadas con SLGO-95.

Las muestras S2 provenientes de ovas de trucha arco iris (*O. mykiss*) desafiadas con las cepas LF-89 (S2T-LF<sub>1</sub>, S2T-LF<sub>3</sub>, S2T-LF<sub>5</sub>, S2T-LF<sub>10</sub>, S2T-LF<sub>30</sub> y S2T-LF<sub>60</sub>) y SLGO-95 (S2T-SLGO<sub>1</sub>, S2T-SLGO<sub>3</sub>, S2T-SLGO<sub>5</sub>, S2T-SLGO<sub>10</sub>, S2T-SLGO<sub>30</sub> y S2T-SLGO<sub>60</sub>) fueron todas negativas al “dot-blot”, desde 1 hasta los 60 min de desafío ova-bacteria. Estos

<sup>1</sup> Muestra final; muestra obtenida a partir del homogenizado y proceso de centrifugación de las ovas desafiadas (figura 1, Materiales y Métodos). Esta muestra es la definitiva para usar en “dot-blot” según estándar del método.

resultados también fueron obtenidos en dos películas fotosensibles expuestas durante dos tiempos a la membrana PVDF (10 y 20 min).

#### **A.4- Comparación de las cinéticas de infección con *P. salmonis* de ovas de salmón del Atlántico y trucha arco iris**

Algunos resultados de positividad, obtenidos por las muestras provenientes de las cinéticas de infección de ambas especies de ovas, se obtuvieron a partir de muestras no consideradas durante la parte teórica de esta memoria de título. Además, los resultados para las distintas especies se obtuvieron a partir de películas expuestas a la membrana PVDF durante distintos tiempos. Esto no permitió realizar comparaciones entre los resultados de las cinéticas obtenidos para cada especie de ovas.

Los resultados dentro de una misma especie de ova, obtenidos a partir de una misma membrana PVDF y a una misma película, tampoco pudieron ser comparados de forma relativa dado las características de los resultados obtenidos durante el presente trabajo.

Las razones por la cuáles no se pudo hacer las comparaciones establecidas en forma teórica en Materiales y Métodos se presentan en la discusión del presente trabajo.

#### **A.5- Síntesis de resultados obtenidos mediante la metodología “dot-blot”**

##### **A.5.1- Resultados de positividad a la metodología “dot-blot” de muestras provenientes de las cepas usadas en los desafíos de ovas de salmónidos (controles positivos)**

A continuación se resume los resultados de las distintas muestras provenientes de las cepas de desafío de ovas (SLGO-95 y LF-89) usadas durante las experiencias “dot-blot” en la presente memoria de título (tabla 14).

A partir de la cepa de desafío SLGO-95 se utilizó una alícuota como control positivo para los “dot-blot” (SLGO $\beta$ ), la cuál generó puntos de positividad en películas que fueron expuestas a la membrana PVDF desde 8 min hasta los 30 min (8, 10, 20 y 30 min) en las experiencias descritas anteriormente (tabla 14). Mediante la centrifugación de una alícuota de SLGO $\beta$  se obtuvo dos fracciones denominadas S2-SLGO $\beta$  y P2-SLGO $\beta$ , correspondientes a la fracciones sobrenadante y precipitado de la cepa SLGO-95, respectivamente. La muestra S2-SLGO $\beta$  generó puntos de positividad en las películas expuestas 10 y 30 min a la membrana PVDF (tabla 14). La muestra P2-SLGO $\beta$  fue negativa a la detección de antígenos de *P. salmonis* mediante la metodología “dot-blot”

(tabla 14), la cuál, al igual que la muestra S2-SLGO $\beta$ , sólo se observó en películas expuestas 10 y 30 min a la membrana PVDF.

Por otra parte, a partir de la cepa de desafío LF-89 se utilizó una alícuota como control positivo para los “dot-blot” (LF), la cuál generó puntos de positividad en películas que fueron expuestas a la membrana PVDF desde 2 min hasta los 30 min (2, 5, 8, 10, 20 y 30 min) (tabla 14). Mediante la centrifugación de una alícuota de LF\* se obtuvo dos fracciones denominadas S2-LF\* y P2-LF\*, correspondientes a la fracciones sobrenadante y precipitado de la cepa LF-89, respectivamente. Tanto la muestra S2-LF\* como P2-LF\* generaron puntos de positividad en las películas expuestas 10 y 30 min a la membrana PVDF (tabla 14) donde los puntos de ambas muestras sólo se revelaron en películas expuestas 10 y 30 min a la membrana PVDF.

**Tabla 14.** Resultados de positividad a la metodología “dot-blot” de controles positivos usados en los desafíos de ovas de salmónidos.

| Cepa                 | Fracción <sup>1</sup> | Nomenclatura        | Tiempo (min) de exposición de películas fotosensibles a membrana PVDF <sup>2</sup> |    |    |    |    |    |
|----------------------|-----------------------|---------------------|--|----|----|----|----|----|
|                      |                       |                     | 2  | 5  | 8  | 10 | 20 | 30 |
| SLGO-95 <sup>3</sup> | Sin centrifugar       | SLGO $\beta$        | -  | -  | +  | +  | +  | +  |
|                      | Sobrenadante (S2)     | S2-SLGO $\beta$     | ND   | ND | ND | +  | ND | +  |
|                      | Precipitado (P2)      | P2-SLGO $\beta$     | ND   | ND | ND | -  | ND | -  |
| LF-89                | Sin centrifugar       | LF <sup>4</sup>     | +  | +  | +  | +  | +  | +  |
|                      | Sobrenadante (S2)     | S2-LF* <sup>5</sup> | ND   | ND | ND | +  | ND | +  |
|                      | Precipitado (P2)      | P2-LF* <sup>6</sup> | ND   | ND | ND | +  | ND | +  |

1. Fracción producto de la centrifugación a 11.024 x g de cada muestra (figura 2 de Materiales y Métodos).
  2. Membrana de polivinildifluoruro (Immun-Blot<sup>®</sup> PVDF “membrane for protein blotting” 0,2  $\mu$ m, BioRad<sup>®</sup>).
  3. SLGO-95; cepa usada en el desafío de ovas de salmón del Atlántico (*Salmo salar*) y trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) en la segunda y tercera experiencia.
  4. LF-89; cepa usada en el desafío de ovas de salmón del Atlántico (*Salmo salar*) y trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) en la segunda y tercera experiencia.
  - 5 y 6. Fracciones provenientes de la muestra LF\*, la cuál corresponde a una suspensión bacteriana cepa LF-89 de *Piscirickettsia salmonis* usada como desafío durante la estandarización del método “dot-blot” para la detección de *P. salmonis* (Gatica, 2007).
- ND: No determinado.

#### A.5.2- Resultados de positividad a la metodología “dot-blot” de las muestras provenientes de ovas de salmón del Atlántico desafiadas con las cepas SLGO-95 y LF-89

En la tabla 15 se expresa un resumen de los resultados a la metodología “dot-blot” de las muestras provenientes de homogeneizado de ovas de salmón del Atlántico (*S. salar*) desafiadas con dos cepas de *P. salmonis*.

Respecto de los resultados de las muestras provenientes de ovas de salmón del atlántico (*S. salar*) desafiadas con la cepa SLGO-95, las denominadas A-SLGO<sub>n</sub>, donde n es el tiempo (en minutos) de desafío, correspondientes a la fracción P2 o muestra final del proceso de centrifugación (figura 1 en Materiales y Métodos) fueron negativas a la presencia de antígenos bacterianos mediante su detección con la metodología “dot-blot”. Por otro lado, las denominadas S2A-SLGO<sub>n</sub>, de las cuales sólo se conservaron las desafiadas durante los tiempos 10 y 60 min, si generaron positividad mediante el “dot-blot”, donde la muestra S2A-SLGO<sub>10</sub> presentó positividad en las dos películas expuestas 10 y 30 min a la membrana PVDF, mientras que S2A-SLGO<sub>60</sub> sólo presentó positividad en la película expuesta 30 min a la membrana PVDF. En el caso de la muestra P1A-SLGO<sub>5</sub>, proveniente de la fracción P1 (figura 1 de Materiales y Métodos), también fue negativa (tabla 15).

En el caso de las muestras provenientes de ovas de salmón del atlántico (*S. salar*) desafiadas con la cepa LF-89, las denominadas A-LF<sub>n</sub>, donde n es el tiempo (en minutos) de desafío, correspondientes a la fracción P2 o muestra final del proceso de centrifugación (figura 2 en Materiales y Métodos) fueron negativas a la presencia de antígenos bacterianos mediante su detección con la metodología “dot-blot”. Por otro lado, las denominadas S2A-LF<sub>n</sub>, de las cuales sólo se conservaron las desafiadas durante los tiempos 10 y 60 min, si generaron positividad mediante el “dot-blot”, donde las muestras S2A-LF<sub>10</sub> y S2A-LF<sub>60</sub> presentaron positividad en la película expuestas 30 min a la membrana PVDF. En el caso de la muestra P1hA-LF<sub>5</sub>, proveniente de la fracción P1 y sometida a calor, esta fue positiva a la metodología “dot-blot” sólo en la película expuesta a la membrana PVDF durante 20 min (tabla 15).

**Tabla 15.** Resumen de resultados a la metodología “dot-blot” de las muestras provenientes de ovas de salmón del Atlántico (*Salmo salar*) desafiadas con las cepas SLGO-95 y LF-89.

| Cepa desafío      | Tiempo desafío | Fracción <sup>2</sup>         | Nomenclatura                      | Tiempo (min) de exposición de películas fotosensibles a membrana PVDF <sup>1</sup> |    |    |    |    |    |
|-------------------|----------------|-------------------------------|-----------------------------------|--|----|----|----|----|----|
|                   |                |                               |                                   | 2  | 5  | 8  | 10 | 20 | 30 |
| SLGO-95           | 1 min          | Precipitado (P2)              | A-SLGO <sub>1</sub>               | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
|                   | 3 min          | Precipitado (P2)              | A-SLGO <sub>3</sub>               | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
|                   | 5 min          | Precipitado (P1)*             | P1A-SLGO <sub>5</sub>             | ND   | ND | ND | -  | -  | ND |
|                   |                | Precipitado (P2)              | A-SLGO <sub>5</sub>               | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
|                   | 10 min         | Precipitado (P2)              | A-SLGO <sub>10</sub>              | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
|                   |                | Sobrenadante (S2)             | S2A-SLGO <sub>10</sub>            | ND   | ND | ND | +  | ND | +  |
|                   | 30 min         | Precipitado (P2)              | A-SLGO <sub>30</sub>              | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
|                   | 60 min         | Precipitado (P2)              | A-SLGO <sub>60</sub>              | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| Sobrenadante (S2) |                | S2A-SLGO <sub>60</sub>        | ND                                | ND   | ND | -  | ND | +  |    |
| LF-89             | 1 min          | Precipitado (P2)              | A-LF <sub>1</sub>                 | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
|                   | 3 min          | Precipitado (P2)              | A-LF <sub>3</sub>                 | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
|                   | 5 min          | Precipitado (P1) <sup>3</sup> | P1hA-LF <sub>5</sub> <sup>4</sup> | ND   | ND | ND | -  | +  | ND |
|                   |                | Precipitado (P2)              | A-LF <sub>5</sub>                 | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
|                   | 10 min         | Precipitado (P2)              | A-LF <sub>10</sub>                | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
|                   |                | Sobrenadante (S2)             | S2A-LF <sub>10</sub>              | ND   | ND | ND | -  | ND | +  |
|                   | 30 min         | Precipitado (P2)              | A-LF <sub>30</sub>                | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
|                   | 60 min         | Precipitado (P2)              | A-LF <sub>60</sub>                | -  | -  | -  | -  | -  | +  |
| Sobrenadante (S2) |                | S2-LF <sub>60</sub>           | ND                                | ND   | ND | -  | ND | +  |    |

1. Membrana de polivinildifluoruro (Immun-Blot® PVDF “membrane for protein blotting” 0,2 µm, BioRad®).
  2. Fracción producto de la centrifugación a 11.024 x g de cada muestra (figura 1 de Materiales y Métodos).
  3. Fracción P1, corresponde a la fracción precipitada durante la centrifugación a 2.200 x g.
  4. Muestra de fracción P1 (figura 1 de Materiales y Métodos) de ova de salmón del Atlántico (*S. salar*) desafiada durante 5 min a LF-89, y sometida a calor.
- ND: No determinado.

### **A.5.3- Resultados de positividad a la metodología “dot-blot” de las muestras provenientes de ovas de trucha arco iris desafiadas con las cepas SLGO-95 y LF-89**

En la tabla 16 se expresa un resumen de los resultados a la metodología “dot-blot” de las muestras provenientes de homogeneizado de ovas de trucha arco iris (*O. mykiss*) desafiadas con dos cepas de *P. salmonis*.

Respecto de los resultados de las muestras provenientes de ovas de trucha arco iris (*O. mykiss*) desafiadas tanto con la cepa SLGO-95, las denominadas T-SLGO<sub>n</sub>, donde n es el tiempo (en minutos) de desafío, correspondientes a la fracción P2 o muestra final del

proceso de centrifugación (figura 1 en Materiales y Métodos), fueron positivas a la presencia de antígenos bacterianos las muestras provenientes de ovas desafiadas a la bacteria durante 1, 3, 10 y 60 min (T-SLGO<sub>1</sub>, T-SLGO<sub>3</sub>, T-SLGO<sub>10</sub> y T-SLGO<sub>60</sub>). Mientras que las ovas de esta misma especie desafiadas con la cepa SLGO-95, las denominadas T-LF<sub>n</sub>, donde n es el tiempo (en minutos) de desafío, fueron todas negativas.

Las muestras denominadas S2T-SLGO<sub>n</sub> y S2T-LF<sub>n</sub>, fracciones S2 de todas las ovas de trucha arco iris (*O. mykiss*) teóricamente infectadas, no generaron positividad al “dot-blot” (tabla 16). Todos estos resultados fueron obtenidos a partir de una película expuesta a la membrana PVDF durante 20 min.

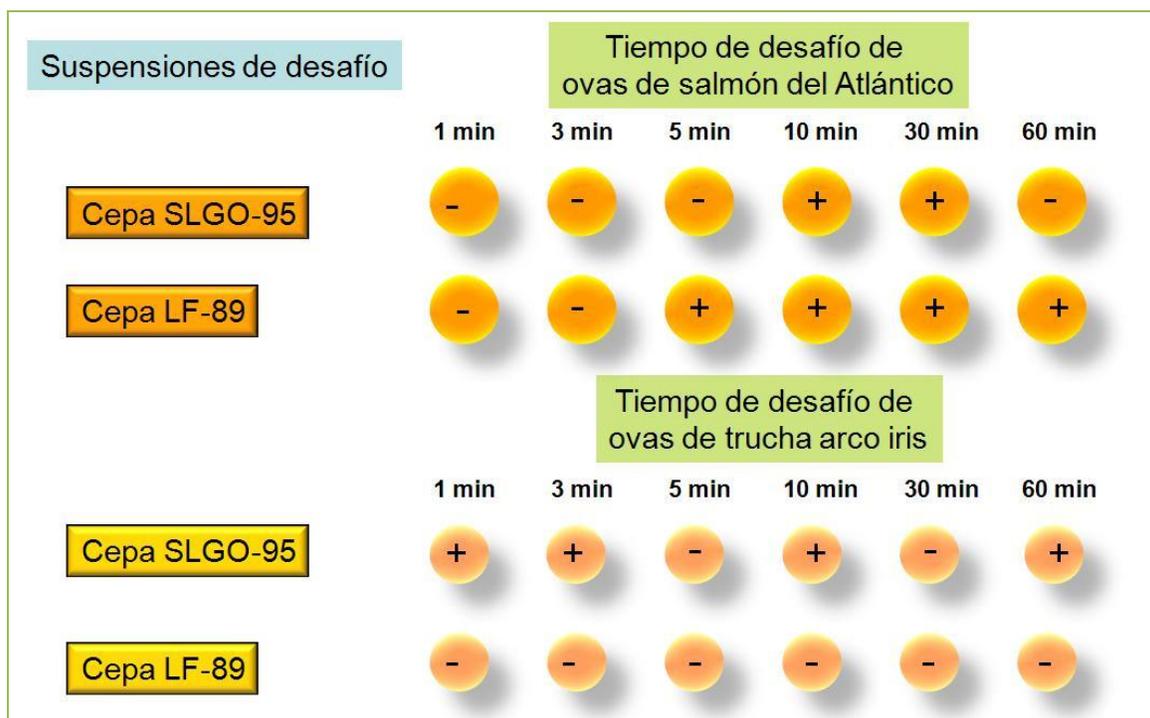
**Tabla 16.** Resumen de resultados a la metodología “dot-blot” de las muestras provenientes de ovas de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) desafiadas con las cepas SLGO-95 y LF-89.

| Cepa desafío | Tiempo desafío    | Fracción <sup>2</sup>  | Nomenclatura           | Tiempo (min) de exposición de películas fotosensibles a membrana PVDF <sup>1</sup> |    |
|--------------|-------------------|------------------------|------------------------|--|----|
|              |                   |                        |                        | 20   | 30 |
| SLGO-95      | 1 min             | Precipitado (P2)       | T-SLGO <sub>1</sub>    | +  | +  |
|              |                   | Sobrenadante (S2)      | S2T-SLGO <sub>1</sub>  | -  | -  |
|              | 3 min             | Precipitado (P2)       | T-SLGO <sub>3</sub>    | +  | +  |
|              |                   | Sobrenadante (S2)      | S2T-SLGO <sub>3</sub>  | -  | -  |
|              | 5 min             | Precipitado (P2)       | T-SLGO <sub>5</sub>    | -  | -  |
|              |                   | Sobrenadante (S2)      | S2T-SLGO <sub>5</sub>  | -  | -  |
|              | 10 min            | Precipitado (P2)       | T-SLGO <sub>10</sub>   | +  | +  |
|              |                   | Sobrenadante (S2)      | S2T-SLGO <sub>10</sub> | -  | -  |
|              | 30 min            | Precipitado (P2)       | T-SLGO <sub>30</sub>   | -  | -  |
|              |                   | Sobrenadante (S2)      | S2T-SLGO <sub>30</sub> | -  | -  |
| 60 min       | Precipitado (P2)  | T-SLGO <sub>60</sub>   | +                      | +  |    |
|              | Sobrenadante (S2) | S2T-SLGO <sub>60</sub> | -                      | -  |    |
| LF-89        | 1 min             | Precipitado (P2)       | T-LF <sub>1</sub>      | -  | -  |
|              |                   | Sobrenadante (S2)      | S2T-LF <sub>1</sub>    | -  | -  |
|              | 3 min             | Precipitado (P2)       | A-LF <sub>3</sub>      | -  | -  |
|              |                   | Sobrenadante (S2)      | S2T-LF <sub>3</sub>    | -  | -  |
|              | 5 min             | Precipitado (P2)       | T-LF <sub>5</sub>      | -  | -  |
|              |                   | Sobrenadante (S2)      | S2T-LF <sub>5</sub>    | -  | -  |

|       |        |                   |                      |   |   |
|-------|--------|-------------------|----------------------|---|---|
| LF-89 | 10 min | Precipitado (P2)  | T-LF <sub>10</sub>   | - | - |
|       |        | Sobrenadante (S2) | S2T-LF <sub>10</sub> | - | - |
|       | 30 min | Precipitado (P2)  | T-LF <sub>30</sub>   | - | - |
|       |        | Sobrenadante (S2) | S2T-LF <sub>30</sub> | - | - |
|       | 60 min | Precipitado (P2)  | T-LF <sub>60</sub>   | - | - |
|       |        | Sobrenadante (S2) | S2T-LF <sub>60</sub> | - | - |

1. Membrana de polivinildifluoruro (Inmun-Blot® PVDF “membrane for protein blotting” 0,2 µm, BioRad®).
  2. Fracción producto de la centrifugación a 11.024 x g de cada muestra (figura 1 de Materiales y Métodos).
- ND: No determinado.

A continuación en la figura 14 se presenta un esquema con los resultados al “dot-blot” de cada muestra de ova desafiada con las distintas suspensiones usadas, independiente del tipo de muestra usada (P1, S2 o P2) o de los tiempos de exposición de película a membrana PVDF.

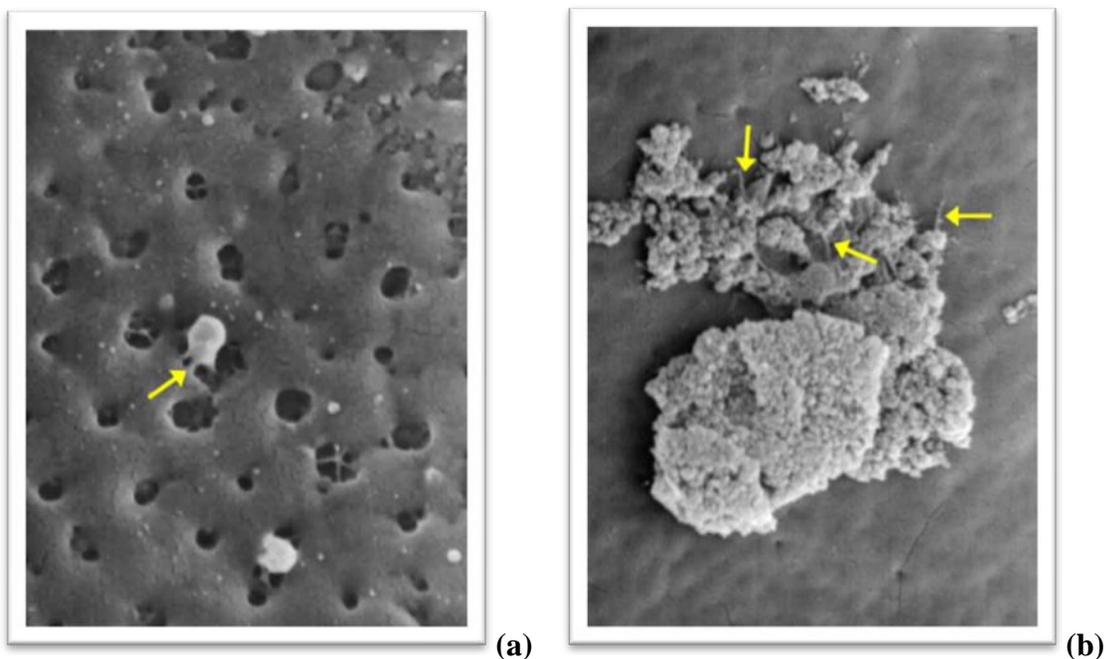


**Figura 14.** Resultados del “dot-blot” para la detección de *Piscirickettsia salmonis* en las ovas de dos especies de salmónidos (salmón del Atlántico y trucha arco iris) desafiadas con dos suspensiones bacterianas (cepas SLGO-95 y LF-89).

## B- Observación mediante microscopía electrónica de barrido (MEB) de la infección de ovas de salmón del Atlántico y trucha arco iris con dos cepas de *P. salmonis*

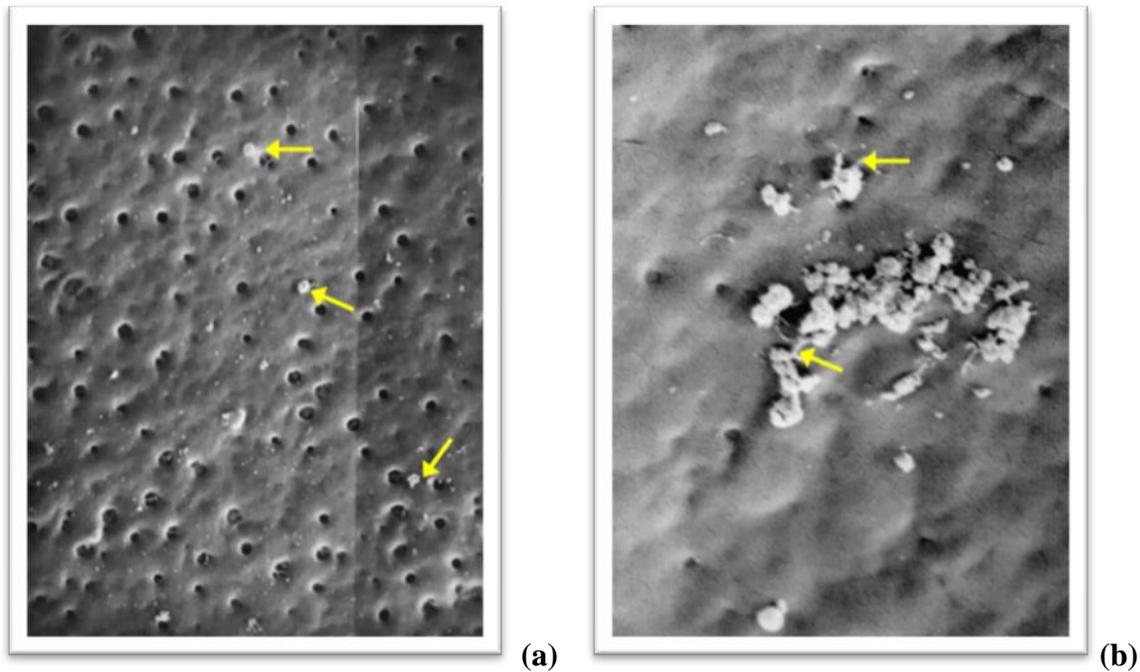
A continuación se entregan las imágenes generadas mediante MEB de ovas de salmón del Atlántico (*S. salar*) y trucha arco iris (*O. mykiss*) desafiadas durante 5 min tanto con la cepa SLGO-95 como la cepa LF-89.

En las imágenes de la figura 15, se observa la superficie de la ova de salmón del Atlántico (*S. salar*) (figura 15a), con un aumento de 10.000x, cómo una bacteria *P. salmonis* (cepa SLGO-95) se adhiere a la superficie de la ova mediante unas prolongaciones denominadas complejo de adhesión piscirickettsial (CAP). Además, se muestra otra imagen (figura 15b) donde agrupaciones de bacterias de *P. salmonis* (cepa SLGO-95) se encuentran sobre la superficie coriónica de la ova de trucha arco iris (*O. mykiss*), donde también se observan CAP. Este hecho demuestra visualmente que, a los 5 min de desafío con la cepa SLGO-95 de *P. salmonis* sobre ovas de ambas especies, la bacteria se encuentra adherida por lo menos en la superficie de la ova.



**Figura 15.** En la imagen (a), con aumento de 10.000x, se observa una bacteria *Piscirickettsia salmonis*, cepa SLGO-95, adherida a la superficie de una ova de salmón del Atlántico (*Salmo salar*). Mientras que en la imagen (b), con aumento de 4.500x, se observan bacterias agrupadas de la misma cepa sobre la superficie de una ova de la especie trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*). Las flechas señalan la presencia del complejo de adhesión piscirickettsial (CAP).

Respecto al desafío de ovas con la cepa LF-89, se pueden observar varias bacterias de *P. salmonis* en la superficie de la ova de salmón del Atlántico (*S. salar*) (figura 16a) y trucha arco iris (*O. mykiss*) (figura 16b). Sobre la superficie coriónica de ambas especies salmonídeas se puede observar la presencia de CAP, las cuales están señaladas por una flecha en las imágenes 16a y 16b.



**Figura 16.** En la figura (a), con aumento 4.500x, se observan varias bacterias (cepa LF-89, *Piscirickettsia salmonis*) sobre la superficie de una ova de salmón del Atlántico (*Salmo salar*). Mientras que en la imagen (b), con aumento de 10.000x, se observan bacterias de la misma cepa agrupadas sobre la superficie de una ova de la especie trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*). Las flechas señalan la presencia del complejo de adhesión piscirickettsial (CAP).

## DISCUSIÓN

Las ovas de salmón del Atlántico (*Salmo salar*) y de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) usadas en la presente memoria de título fueron aportadas gentilmente por Marine Harvest Chile S.A. y enviadas desde un centro de cultivo de la décima región, donde el tiempo transcurrido desde que fueron fresadas hasta su utilización en los experimentos no superó las 24 h. Éstas fueron empacadas, con el fluido celómico de las propias hembras fresadas para preservar su estado, dentro de unas bolsas plásticas que fueron selladas posteriormente a la introducción de oxígeno en su interior para permitir oxigenación de las ovas. Estas bolsas se mantuvieron durante el viaje a una temperatura aproximada de 4° C. El criterio de selección de ovas a partir del “pool”, se basó en la observación de ciertas características tales como: color anaranjado intenso, translúcido y sin presencia de precipitación de proteínas. 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. Es importante destacar que el método de transporte y de mantención de las ovas permite obtener buenos resultados en la fertilización *in vitro* inclusive hasta las 48 h posterior al desove (Blanco, 1995).

Hasta la fecha no existen estudios sobre la detección de *Piscirickettsia salmonis* mediante la metodología “dot-blot”, por lo cuál, el presente trabajo y la estandarización del método realizado previamente (Gatica, 2007) son las primeras experiencias de esta técnica para la detección de esta bacteria. Mediante esta metodología se buscó caracterizar la cinética de infección de ovas de dos especies salmonídeas (salmón del Atlántico y trucha arco iris) con dos cepas bacterianas de *P. salmonis* (SLGO-95 y LF-89).

Con los resultados obtenidos en los “dot-blot” y microscopía electrónica de barrido (MEB) realizados en la presente memoria de título se prueba que las dos especies de ovas (salmón del Atlántico y trucha arco iris) desafiadas con las suspensiones bacterianas son susceptibles a la infección con las cepas SLGO-95 y LF-89 de *P. salmonis*. Durante todos los experimentos realizados, se comprobó el buen comportamiento de la técnica “dot-blot” para la detección de *P. salmonis*, y los resultados de los controles positivos y negativos generaron los resultados esperados.

Durante el desarrollo de las experimentaciones se fueron presentando situaciones que hicieron variar ciertas etapas de la metodología “dot-blot” para permitir optimizar los resultados. Además, se coligió que la forma de analizar los resultados establecidos teóricamente no era aplicable. Estas variaciones se aclaran a continuación durante la presente discusión.

El pixelaje que generó la muestra control positivo de infección con SLGO-95 denominada SLGO $\beta$ <sup>1</sup>, fue menor a lo esperado respecto a lo observado hasta la fecha en “dot-blot” para suspensiones bacterianas filtradas desde botella. Este resultado fue menor en comparación con lo generado por la muestra LF\*<sup>2</sup> y LF, esta última usada junto con SLGO $\beta$  en el desafío o cinética de infección principal realizado en el presente trabajo (tabla 5 y 12, Resultados).

Este resultado motivó que se realizara un experimento piloto para confirmar si la diferencia de intensidad al “dot-blot” entre las suspensiones bacterianas SLGO-95 y LF-89 correspondían sólo al efecto de la concentración de bacterias de cada suspensión y no a un distinto comportamiento de cada cepa a los anticuerpos monoclonales del “kit” comercial. Este experimento consistió en someter a centrifugación a 11.427 x g durante 60 min a 1 mL de suspensión bacteriana con SLGO\*<sup>3</sup> y así lograr concentrar en el “pellet” o precipitado a todas las bacterias presentes, luego este “pellet” se resuspendió en 150  $\mu$ L de PBS (pH=7,4) para generar la muestra P2. Los productos de la centrifugación de SLGO\*, la fracción sobrenadante (S2-SLGO\*) y la fracción precipitada resuspendida (P2-SLGO\*), fueron ambas positivas al “dot-blot”. El número de píxeles de estas muestras (tabla 3, Resultados) confirma que el bajo pixelaje alcanzado por la muestra SLGO se debió a una baja concentración bacteriana, mientras que el hecho que la muestra S2-SLGO\* fuera positiva aclara que el método de centrifugación (figura 2, Materiales y Métodos) no fue capaz de concentrar la totalidad de las bacterias de *P. salmonis* en el “pellet”, al menos para la cepa

---

<sup>1</sup> SLGO $\beta$ ; suspensión bacteriana filtrada de botella de cultivo celular infectado con la cepa SLGO-95 de *P. salmonis*, usada durante el desafío principal de ovas salmonídeas.

<sup>2</sup> LF\*; suspensión bacteriana filtrada de botella de cultivo celular infectado con la cepa LF-89 de *P. salmonis*, usada con éxito como control positivo durante la estandarización del método.

<sup>3</sup> SLGO\*; suspensión bacteriana filtrada de botella de cultivo celular infectado con la cepa SLGO-95 de *P. salmonis*, distinta a la usada durante el primer desafío de ovas de salmón del Atlántico, pero con el mismo número de pasajes (n=10) y similar porcentaje de efecto citopático (cercano al 80%) que SLGO.

SLGO-95, lo que se pudo deber a rupturas bacterianas y/o pérdidas de antígeno bacteriano desde la bacteria a la suspensión.

Las muestras SLGO $\beta$  y LF, usadas en la cinética de infección durante el desafío principal<sup>4</sup>, también fueron sometidas al experimento piloto según protocolo de centrifugación esquematizado en la figura 2 de Materiales y Métodos. En ambos casos, las fracciones S2 de cada suspensión bacteriana generaron positividad al “dot-blot” (figuras 7 y 8, Resultados), lo cuál confirma que el protocolo de centrifugación usado no consiguió precipitar las bacterias de las cepas de *P. salmonis* usadas en el presente trabajo.

La primera variación al método de detección de *P. salmonis* se realizó a partir de los “dot-blot” de las muestras de ovas teóricamente infectadas durante el desafío principal. Ésta correspondió a un aumento en los tiempos de exposición de la película fotosensible a la membrana de polivinildifluoruro (PVDF), que según lo estandarizado, bastaba con un tiempo entre 2 y 8 min. Este incremento en los tiempos, que fueron de 10 a 30 min, se estableció luego que durante la primera experiencia<sup>5</sup> las muestras finales provenientes de ovas teóricamente infectadas durante el primer desafío<sup>6</sup> fueron negativas al “dot-blot”. Ello pudo deberse a una baja concentración de bacterias presentes en la suspensión de desafío, por lo que se hizo necesario un tiempo mayor para que la quimioluminiscencia generara píxeles en la película.

El aumento de los tiempos de exposición de película a membrana PVDF, durante los “dot-blot” realizados en la segunda experiencia<sup>7</sup>, permitieron evidenciar a la única muestra final, o fracción P2, proveniente de ovas de salmón del Atlántico (*S. salar*) desafiadas con las dos cepas de *P. salmonis* que fue positiva al “dot-blot” (A-LF<sub>60</sub>, figura 9 de Resultados) la cuál expresó su positividad sólo en la película fotosensible que fue expuesta durante 30 min a la membrana PVDF.

Debido a que durante la primera experiencia se observó que el protocolo de centrifugación usado no era capaz de concentrar todas las bacterias o estructuras

---

<sup>4</sup> Desafío principal; desafío de ovas de dos especies de salmónidos (salmón del Atlántico y trucha arco iris) con dos cepas de *P. salmonis* (SLGO-95 y LF-89).

<sup>5</sup> Primera experiencia; experimentos realizados a partir de muestras de ovas de salmón del Atlántico (*S. salar*) teóricamente infectadas con la cepa SLGO-95 de *P. salmonis* (primer desafío<sup>6</sup>).

<sup>6</sup> Primer desafío; desafío de ovas de salmón del Atlántico (*S. salar*) con la cepa SLGO-95 de *P. salmonis* realizado previo al desafío principal.

<sup>7</sup> Segunda experiencia; experimentos realizados a partir de muestras de ovas de salmón del Atlántico (*Salmo salar*) teóricamente infectadas con dos cepas de *Piscirickettsia salmonis* (desafío principal<sup>4</sup>).

bacterianas en el “pellet”, se guardaron cuatro alícuotas de la fracción S2 del proceso de obtención de la muestra final a partir del homogeneizado de ovas de salmón del Atlántico (*S. salar*) desafiadas a la bacteria durante el desafío principal (segunda experiencia). Estas muestras provinieron de cuatro ovas de salmón del Atlántico (*S. salar*), dos desafiadas durante 10 min y dos durante 60 min, respectivamente estos pares de ovas fueron desafiados con la cepa SLGO-95 (S2A-SLGO<sub>10</sub> y S2A-SLGO<sub>60</sub>) y con la cepa LF-89 (S2A-LF<sub>10</sub> S2A-LF<sub>60</sub>). Estas cuatro muestras resultaron ser positivas al “dot-blot” (figura 10, Resultados). Además se observó positividad en una fracción P1 proveniente de la primera centrifugación del homogeneizado de una ova de salmón del Atlántico (*S. salar*) desafiada con la cepa LF-89 durante 5 min (P1hA-LF<sub>5</sub>, figura 11 de Resultados). Estos resultado demuestran que las ovas de salmón del Atlántico (*S. salar*) son susceptibles a la infección con ambas cepas de *P. salmonis*, y además confirma que, durante el proceso de centrifugación para la obtención de muestra final, se pierden antígenos o estructuras bacterianas en fracciones de la primera (P1) y segunda centrifugación (S2).

Durante la tercera experiencia<sup>8</sup>, solo las muestras finales de los homogenizados de ovas de trucha arco iris (*O. mykiss*) desafiadas durante 1, 3, 10 y 60 min con la cepa SLGO-95 de *P. salmonis* fueron positivas al “dot-blot”. Por otro lado, todas las muestras finales provenientes de ovas desafiadas con la cepa LF-89 de *P. salmonis* fueron negativas al “dot-blot”, lo que difiere con los resultados de la microscopía electrónica de barrido (MEB) discutida mas adelante y con los obtenidos hace un par de años por Gatica (2007), donde mediante la misma técnica “dot-blot” se observó que la cepa LF-89 si era capaz de infectar ovas de esta especie.

Por lo observado en la segunda experiencia, donde hubo positividad en algunas muestras sobrenadantes (S2), se procuró guardar la totalidad de las fracciones S2 del proceso de centrifugación de los homogenizados de las ovas de trucha arco iris (*O. mykiss*) desafiadas a las suspensiones bacterianas SLGO $\beta$  y LF, para someterlas a “dot-blot”. La totalidad de estas muestras S2, desafiadas tanto con la cepa SLGO-95 (S2T-SLGO<sub>1</sub>, S2T-SLGO<sub>3</sub>, S2T-SLGO<sub>5</sub>, S2T-SLGO<sub>10</sub>, S2T-SLGO<sub>30</sub> y S2T-SLGO<sub>60</sub>) como con LF-89 (S2T-

---

<sup>8</sup> Experimentos realizados a partir de muestras de ovas de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) teóricamente infectadas con dos cepas de *P. salmonis* (desafío principal<sup>4</sup>).

LF<sub>1</sub>, S2T-LF<sub>3</sub>, S2T-LF<sub>5</sub>, S2T-LF<sub>10</sub>, S2T-LF<sub>30</sub> y S2T-LF<sub>60</sub>), fueron negativas al “dot-blot” en las dos películas fotosensibles expuestas durante 20 y 30 min a la membrana PVDF.

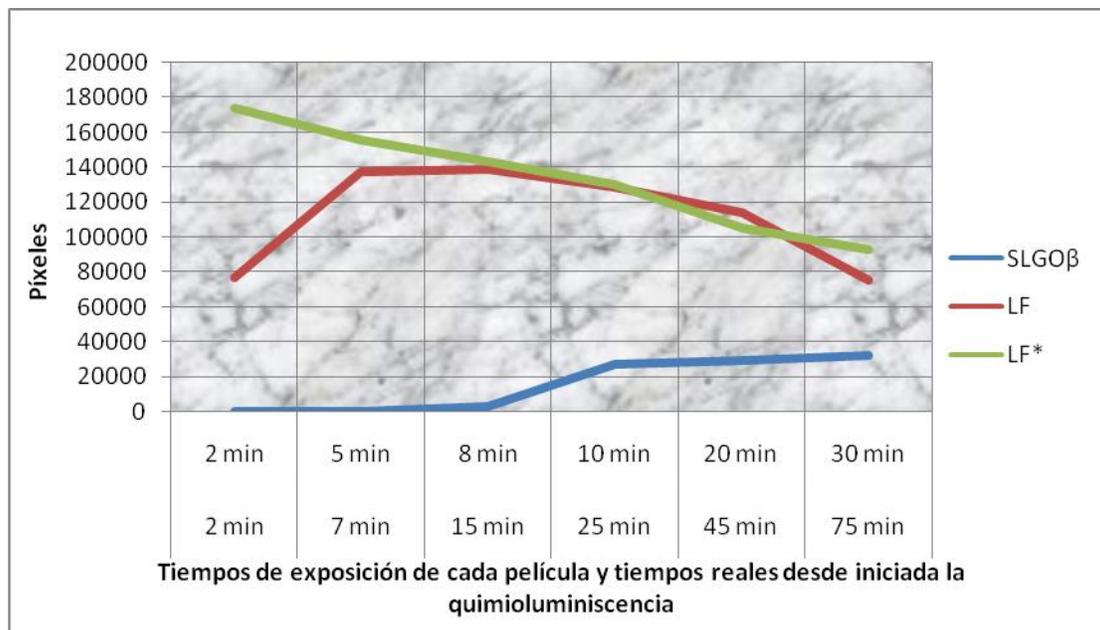
La negatividad de muchas muestras finales provenientes de las dos cinéticas realizadas (primer desafío y desafío principal) obedece sin dudas a la ausencia o baja cantidad de bacterias o estructuras bacterianas presentes en ellas. Un factor que contribuyó a esto último fue la menor concentración o número de bacterias, respecto a muestra tipo usada durante la estandarización de la técnica “dot-blot” (LF\*), presentes en las suspensiones bacterianas (SLGOβ y LF) usadas en los desafíos de ovas (tabla 2 y 4, Resultados). Otro factor que influyó, discutido anteriormente, fue la pérdida de antígenos o estructuras bacterianas durante el proceso de obtención de muestra final.

Las variables que pudieron provocar la pérdida de bacterias o estructuras bacterianas durante el protocolo de centrifugación usado en la obtención de muestras finales se puede explicar por la posible presencia de tamaños bacterianos con bajo peso molecular, lisis bacteriana y/o efectos mecánicos. Fryer *et al.* (1990), observaron una gran variedad de tamaños en que se puede presentar esta bacteria (0,5 a 1,5 μm), lo mismo confirmó Quinteros (2006) (0,2 y 1,5 μm). Basándose en lo anterior, pudo existir una presencia importante de bacterias de pequeño tamaño y bajo peso molecular que se detectaron en la fracción S2. Además de esto, la lisis bacteriana por causas físicas o químicas, durante el proceso de utilización y conservación de muestra, pudo liberar antígenos que quedaron en la fracción S2. Por último, algunas bacterias adheridas al corion de la ova o por efecto de arrastramiento de estructuras groseras durante la primera centrifugación, llevaron bacterias en la fracción P1 (figura 11, Resultados).

Se hace necesario que, en futuros trabajos de detección de *P. salmonis* mediante “dot-blot”, se optimice el procedimiento de obtención de muestra final para asegurar que todas las estructuras bacterianas se concentren en la fracción P2. Esto se aseguraría aumentando la velocidad y tiempos de la segunda centrifugación. También se podría usar como muestra en “dot-blot” la fracción S1 (sobrenadante de la primera centrifugación del homogenizado de ovas) para lo cuál se debería determinar el volumen de carga óptimo para que generaran resultados claros.

Por lo observado en las distintas películas fotosensibles reveladas, la quimioluminiscencia generada por distintas muestras cargadas sobre una misma membrana

PVDF no presentó el mismo patrón de distribución a lo largo del tiempo. Un ejemplo de esto se observa en la figura 6 y gráfico 4 de Resultados, que corresponde a “dot-blot” de controles positivos. Lo mismo se observa en casi todos los “dot-blot” realizados donde se utilizó más de una película fotosensible (gráficos 1, 2, 4, 5, 9 y 10). Para dejar mas aclarada esta situación, en el gráfico 14 se presentan las curvas de distribución de las quimioluminiscencias generadas por los controles positivos del ejemplo anterior.



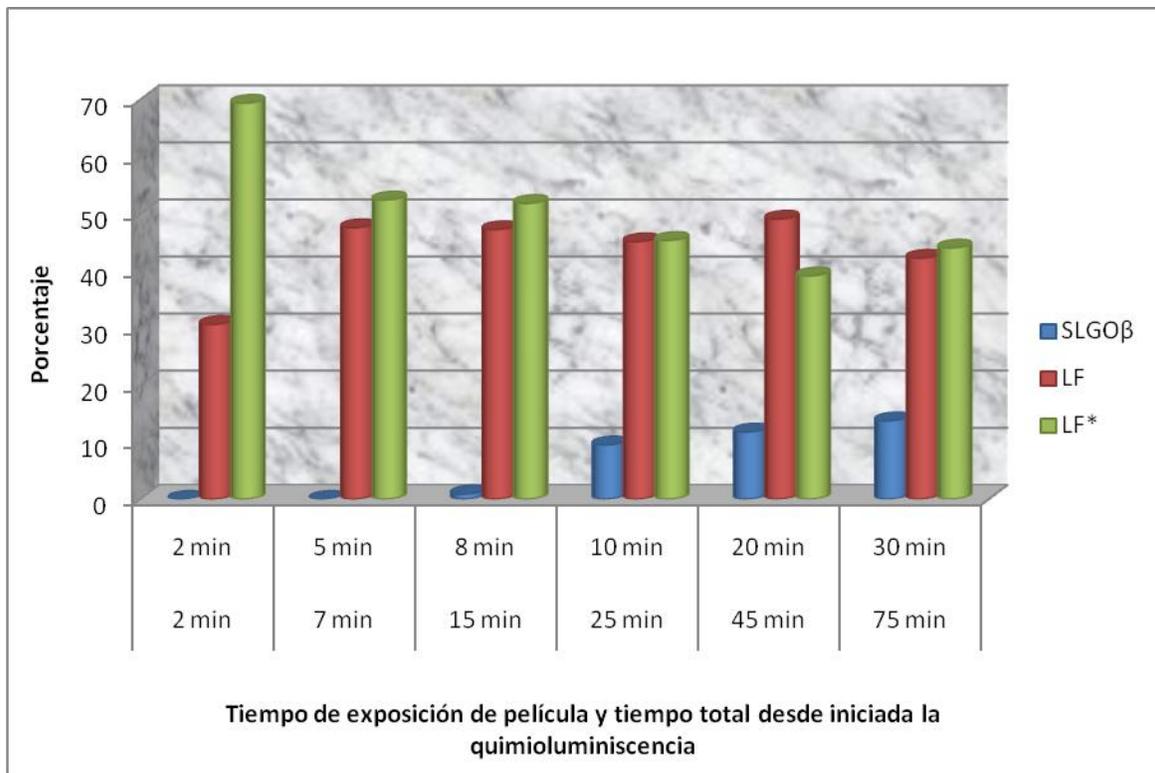
**Gráfico 14.** Curvas de distribución de las quimioluminiscencias generadas por los controles positivos a lo largo del tiempo (2 a 75 min). Los tres controles usados (SLGOβ<sup>1</sup>, LF<sup>2</sup> y LF\*<sup>3</sup>) fueron cargadas sobre una misma membrana de polivinildifluoruro (PVDF) en volúmenes iguales (30 µL).

1. Cepa SLGO-95 usada en el desafío principal de ovas salmonídeas.
2. Cepa LF-89 usada en el desafío principal de ovas salmonídeas.
3. Cepa LF-89 usada en durante la estandarización de la técnica “dot-blot” para la detección de *Piscirickettsia salmonis*, la cuál tiene una probada positividad.

El comportamiento de la curva de distribución presentó patrones distintos para cada muestra. Para la muestra SLGOβ la curva presentó una tendencia a aumentar desde los 15 min de iniciada la reacción quimioluminiscente, mientras que para la muestra LF\* la curva tiende a disminuir desde los 2 min hasta el final del registro. Diferente a lo anterior, para la muestra LF la curva presenta un patrón similar a una campana, donde desde los 2 min de iniciada la reacción quimioluminiscente esta aumenta hasta los 7 min, manteniéndose estable hasta los 15 min, luego de lo cuál disminuye hasta el final del registro. Esta situación revela que el comportamiento de la quimioluminiscencia varía a lo largo del tiempo según la muestra utilizada, incluso si pertenecen a una misma cepa bacteriana (LF y

LF\*). Lo anterior se puede deber a diferencias en las concentraciones bacterianas presentes en cada muestra, donde una alta concentración bacteriana pudo hacer disminuir la quimioluminiscencia a medida que pasa el tiempo por un agotamiento de los reactivos del sustrato (ver curva de LF\*, gráfico 14). Mientras, en contraposición, una baja concentración bacteriana permite que la quimioluminiscencia aumente por una presencia de sustrato que es suficiente para el número de estructuras bacterianas presentes (ver curva de SLGO $\beta$ , gráfico 15). Esto demuestra que lo señalado en el catálogo PIERCE 2004 en relación a las características del sustrato usado, donde se indica que el sustrato quimioluminiscente (SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate, Pierce®) genera una quimioluminiscencia estable hasta 24 h de comenzada la interacción peroxidasa-sustrato, no se cumplió en el presente trabajo.

Lo anterior demuestra que a través de la medición del número de píxeles no se pueden realizar comparaciones cuantitativas ni relaciones porcentuales entre muestras distintas, aunque estas sean cargadas en una misma membrana PVDF y observadas en una misma película fotosensible. Para que la prueba pudiera generar resultados comparables, las proporciones entre el número de píxeles de las muestras se debieron mantener indistintamente del tiempo de exposición de la película a la membrana, lo cuál no sucedió en los “dot-blot” del presente trabajo (gráficos 1, 2, 4, 5, 9 y 10). Para ejemplificar esto, se tomó los resultados de la tabla 5 de Resultados, correspondientes a “dot-blot” de controles positivos, y se relativizó en forma porcentual la proporción de píxeles que cada muestra aportaba a la suma total de ellas en cada una de las películas expuesta en los distintos tiempos. Esto se observa a continuación en el gráfico 15.



**Gráfico 16.** Proporciones porcentuales del número de píxeles obtenidos por cada muestra control positivo en las distintas películas fotosensibles expuestas durante distintos tiempos (2, 5, 8, 10, 20 y 30 min). Se observa que las proporciones para cada muestra varían según el tiempo que ha transcurrido desde que comenzó la quimioluminiscencia.

Esto confirma que la metodología “dot-blot” no serviría para obtener resultados cuantitativos o relativos entre valores de una cinética, por lo que hasta aquí sólo se puede decir que mediante esta técnica diagnóstica se pueden obtener resultados cualitativos. Además hay que considerar que esta técnica necesita de mejoramientos en el procedimiento de obtención de muestra a partir de de ovas enteras para lograr que sea una prueba más sensible.

De acuerdo a lo anterior, los resultados obtenidos implican que no es aplicable la comparación de los resultados de positividad obtenidos en las muestras de ovas de ambas especies, dado a que los resultados se obtuvieron a partir de películas expuestas durante distintos tiempos a la membrana PVDF y que las muestras se cargaron en membranas distintas. Tampoco fue posible comparar los resultados de las cinéticas de infección entre las dos cepas usadas (SLGO-95 y LF-89) sobre ovas de una misma especie, dado la gran variabilidad de las curvas de quimioluminiscencia entre películas expuestas a la membrana

PVDF durante distintos tiempos, donde es imposible saber que tiempo de exposición entrega la proporción de valores correcta.

En el resultado de positividad generado por una muestra P1 de ova de salmón del Atlántico (*S. salar*) desafiada con LF-89 durante 5 min (figura 11, Resultados) sólo se observó luego que esta muestra (P1A-LF<sub>5</sub>) fue hervida a 100° C durante 10 min (P1hA-LF<sub>5</sub>). Esto indica que el cambio conformacional de la estructura antigénica expone nuevos y/o mayor número de sitios de unión para el anticuerpo anti-*P. salmonis*. Además, confirma lo establecido durante la estandarización del método (Gatica, 2007) donde se probó que el efecto de denaturación antigénica no afectaba la detección mediante “dot-blot”, indicando que el epitopo antigénico para el anticuerpo anti-*P. salmonis* es de estructura lineal, y que el reconocimiento de los antígenos, por parte del anticuerpo, no se ve afectado por el cambio conformacional de la estructura del antígeno.

Durante el estudio mediante MEB se pudo observar la presencia de prolongaciones bacterianas, al parecer citoplasmáticas, que permitían la unión bacteria-ova. Este fenómeno se observó en ambas especies de ovas y en las dos cepas de *P. salmonis* usadas. Estas prolongaciones son similares a las descritas por Larenas *et al.* (2003), denominadas como complejo de adhesión piscirickettsial (CAP), las cuales se habían observado hasta ahora sólo en muestras de trucha arco iris (*O. mykiss*).

El presente trabajo permitió demostrar en forma experimental que tanto las ovas de salmón del Atlántico (*S. salar*) como las de trucha arco iris (*O. mykiss*) son susceptibles a la infección por parte de *P. salmonis* (cepas SLGO-95 y LF-89). Esta es una información más para mejorar los manejos y controles establecidos para prevenir la transmisión vertical de la piscirickettsiosis. Además, se demuestra que la técnica “dot-blot” sólo se puede usar como método diagnóstico cualitativo, ya que los resultados son muy variables y no permiten establecer resultados cuantitativos o porcentuales a partir del número de píxeles generados por cada muestra.

Finalmente, el método “dot-blot” necesita de nuevas pruebas de estandarización que permitan considerar a esta técnica como un método diagnóstico alternativo para detectar la presencia de la bacteria no sólo en ovas, sino que también en otras muestras provenientes de individuos sospechosos de infección con *P. salmonis*.

## CONCLUSIONES

- ◆ El método “dot-blot” es capaz de detectar la presencia de *Piscirickettsia salmonis* tanto en ovas de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) como de salmón del Atlántico (*Salmo salar*).
- ◆ Las ovas de las dos especies estudiadas (salmón del Atlántico y trucha arco iris) son susceptibles a la infección por parte de las dos cepas de *Piscirickettsia salmonis* usadas (SLGO-95 y LF-89).
- ◆ El tiempo más temprano de detección de *Piscirickettsia salmonis* en ovas de salmón del Atlántico fue a los 5 minutos de exposición.
- ◆ La centrifugación a 11.427 g por 60 min no logró precipitar la totalidad de los antígenos bacterianos de *Piscirickettsia salmonis*.
- ◆ El método “dot-blot” quimioluminiscente no permitió cuantificar proporcionalmente la cantidad de bacterias presente en las muestras por lo que sólo se pudo utilizar como una técnica cualitativa para la detección de *Piscirickettsia salmonis*.
- ◆ El complejo de adhesión piscirickettsial (CAP) es un factor de virulencia que se presenta en la infección por *Piscirickettsia salmonis* en ovas de salmón del Atlántico.

## NOMENCLATURA

### A-. Nomenclatura para muestras usadas durante la primera experiencia

Las muestras utilizadas en los “dot-blot” de esta primera experiencia provienen de suspensiones y ovas usadas en el primer desafío, correspondiente a ovas de salmón del Atlántico (*Salmo salar*) incubadas durante seis tiempos con la cepa SLGO-95 de *Piscirickettsia salmonis*.

- LF\*** : Suspensión bacteriana obtenida a partir del sobrenadante, filtrado a 5 $\mu$ , de una botella de cultivo celular con un efecto citopático (ECP) cercano al 100% e infectada con la cepa LF-89 de *P. salmonis*. Esta suspensión fue usada durante el proceso de estandarización de la metodología “dot-blot” de detección de *P. salmonis* (Gatica, 2007).
- MEM<sub>5</sub>** : Ova de salmón del Atlántico (*S. salar*) incubada durante 5 min a una suspensión de medio esencial mínimo suplementado al 10% con suero fetal bovino (MEM-10), usada como control negativo para el “dot-blot”.
- MEM<sub>60</sub>** : Ova de salmón del Atlántico (*S. salar*) incubada durante 60 min a una suspensión de medio esencial mínimo suplementado al 10% con suero fetal bovino (MEM-10), usada como control negativo para el “dot-blot”.
- P2-SLGO\*** : Fracción precipitada o “pellet” resuspendida en PBS (pH 7,4), resultante de la centrifugación a 11.427 x g de la suspensión bacteriana SLGO\*.
- S2-SLGO\*** : Fracción sobrenadante, resultante de la centrifugación a 11.427 x g de la suspensión bacteriana SLGO\*.
- SLGO\*** : Suspensión bacteriana obtenida a partir del sobrenadante, filtrado a 5 $\mu$ , de una botella de cultivo celular (pasaje 10) con un ECP cercano al 80% e infectada con la cepa SLGO-95 de *P. salmonis*. Esta suspensión provino de una botella distinta a la usada en el desafío de ovas de salmón del Atlántico durante el primer desafío.
- SLGO<sub>1</sub>** : Muestra final proveniente de una ova de salmón del Atlántico (*S. salar*) desafiada durante 1 min a la cepa SLGO-95 de *P. salmonis*.
- SLGO<sub>10</sub>** : Muestra final proveniente de una ova de salmón del Atlántico (*S. salar*) desafiada durante 10 min a la cepa SLGO-95 de *P. salmonis*.
- SLGO<sub>3</sub>** : Muestra final proveniente de una ova de salmón del Atlántico (*S. salar*) desafiada durante 3 min a la cepa SLGO-95 de *P. salmonis*.
- SLGO<sub>30</sub>** : Muestra final proveniente de una ova de salmón del Atlántico (*S. salar*) desafiada durante 30 min a la cepa SLGO-95 de *P. salmonis*.

- SLGO<sub>5</sub>** : Muestra final proveniente de una ova de salmón del Atlántico (*S. salar*) desafiada durante 5 min a la cepa SLGO-95 de *P. salmonis*.
- SLGO<sub>60</sub>** : Muestra final proveniente de una ova de salmón del Atlántico (*S. salar*) desafiada durante 60 min a la cepa SLGO-95 de *P. salmonis*.
- SLGO<sub>m30</sub>** : Muestra final proveniente de una ova de salmón del Atlántico (*S. salar*) desafiada durante 30 min a una suspensión bacteriana muerta de la cepa SLGO-95 de *P. salmonis*, usada como control de la infección de ovas.
- SLGO<sub>m5</sub>** : Muestra final proveniente de una ova de salmón del Atlántico (*S. salar*) desafiada durante 5 min a una suspensión bacteriana muerta de la cepa SLGO-95 de *P. salmonis*, usada como control de la infección de ovas.
- SLGO $\alpha$**  : Suspensión bacteriana obtenida a partir del sobrenadante, filtrado a 5 $\mu$ , de una botella de cultivo celular (pasaje 10) con un ECP cercano al 80% e infectada con la cepa SLGO-95 de *P. salmonis*. Esta suspensión fue la usada en el desafío de ovas de salmón del Atlántico durante el primer desafío y se usó como control positivo del “dot-blot”.

## **B-. Nomenclatura para muestras usadas en la segunda y tercera experiencias**

Las muestras utilizadas en los “dot-blot” la segunda y tercera experiencia provienen de suspensiones y ovas usadas en el desafío principal, donde ovas de salmón del Atlántico (*Salmo salar*) y trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) fueron incubadas durante seis tiempos con las cepas SLGO-95 y LF-89 de *P. salmonis*.

- A-LF<sub>1</sub>** : Muestra final proveniente de una ova de salmón del Atlántico (*S. salar*) desafiada durante 1 min a la cepa LF-89 de *P. salmonis*.
- A-LF<sub>3</sub>** : Muestra final proveniente de una ova de salmón del Atlántico (*S. salar*) desafiada durante 3 min a la cepa LF-89 de *P. salmonis*.
- A-LF<sub>5</sub>** : Muestra final proveniente de una ova de salmón del Atlántico (*S. salar*) desafiada durante 5 min a la cepa LF-89 de *P. salmonis*.
- A-LF<sub>10</sub>** : Muestra final proveniente de una ova de salmón del Atlántico (*S. salar*) desafiada durante 10 min a la cepa LF-89 de *P. salmonis*.
- A-LF<sub>30</sub>** : Muestra final proveniente de una ova de salmón del Atlántico (*S. salar*) desafiada durante 30 min a la cepa LF-89 de *P. salmonis*.
- A-LF<sub>60</sub>** : Muestra final proveniente de una ova de salmón del Atlántico (*S. salar*) desafiada durante 60 min a la cepa LF-89 de *P. salmonis*.
- A-LF<sub>m5</sub>** : Muestra final proveniente de una ova de salmón del Atlántico (*S. salar*) desafiada durante 5 min a una suspensión bacteriana muerta de la cepa LF-89 de *P. salmonis*, usada como control negativo de la infección de ovas.
- A-LF<sub>m30</sub>** : Muestra final proveniente de una ova de salmón del Atlántico (*S. salar*) desafiada durante 30 min a una suspensión bacteriana muerta de la cepa LF-89 de *P. salmonis*, usada como control negativo de la infección de ovas.

- A-MEM<sub>5</sub>** : Muestra final proveniente de una ova de salmón del Atlántico (*S. salar*) incubada durante 5 min a una suspensión de medio esencial mínimo (MEM), usada como control negativo para el “dot-blot”.
- A-MEM<sub>60</sub>** : Muestra final proveniente de una ova de salmón del Atlántico (*S. salar*) incubada durante 60 min a una suspensión de medio esencial mínimo (MEM), usada como control negativo para el “dot-blot”.
- A-SLGO<sub>1</sub>** : Muestra final proveniente de una ova de salmón del Atlántico (*S. salar*) desafiada durante 1 min a la cepa SLGO-95 de *P. salmonis*.
- A-SLGO<sub>3</sub>** : Muestra final proveniente de una ova de salmón del Atlántico (*S. salar*) desafiada durante 3 min a la cepa SLGO-95 de *P. salmonis*.
- A-SLGO<sub>5</sub>** : Muestra final proveniente de una ova de salmón del Atlántico (*S. salar*) desafiada durante 5 min a la cepa SLGO-95 de *P. salmonis*.
- A-SLGO<sub>10</sub>** : Muestra final proveniente de una ova de salmón del Atlántico (*S. salar*) desafiada durante 10 min a la cepa SLGO-95 de *P. salmonis*.
- A-SLGO<sub>30</sub>** : Muestra final proveniente de una ova de salmón del Atlántico (*S. salar*) desafiada durante 30 min a la cepa SLGO-95 de *P. salmonis*.
- A-SLGO<sub>60</sub>** : Muestra final proveniente de una ova de salmón del Atlántico (*S. salar*) desafiada durante 60 min a la cepa SLGO-95 de *P. salmonis*.
- A-SLGO<sub>m5</sub>** : Muestra final proveniente de una ova de salmón del Atlántico (*S. salar*) desafiada durante 5 min a una suspensión bacteriana muerta de la cepa SLGO-95 de *P. salmonis*, usada como control negativo de la infección de ovas.
- A-SLGO<sub>m30</sub>** : Muestra final proveniente de una ova de salmón del Atlántico (*S. salar*) desafiada durante 30 min a una suspensión bacteriana muerta de la cepa SLGO-95 de *P. salmonis*, usada como control negativo de la infección de ovas.
- LF** : Suspensión bacteriana obtenida a partir del sobrenadante, filtrado a 5 $\mu$ , de una botella de cultivo celular con un ECP cercano al 80% e infectada con la cepa LF-89 de *P. salmonis*. Esta suspensión fue la usada en el desafío principal de ovas de las dos especies salmónídeas con las cepas de *P. salmonis*, y se usó como control positivo del “dot-blot”.
- P1A-LF<sub>5</sub>** : Fracción precipitada o “pellet” (P1), subproducto del proceso de obtención de muestra final, de la primera centrifugación (1.208 x g) del homogeneizado de ova de salmón del Atlántico (*S. salar*) desafiada durante 5 min a la cepa LF-89 de *P. salmonis*.
- P1A-SLGO<sub>5</sub>** : Fracción precipitada o “pellet” (P1), subproducto del proceso de obtención de muestra final, de la primera centrifugación (1.208 x g) del homogeneizado de ova de salmón del Atlántico (*S. salar*) desafiada durante 5 min a la cepa SLGO-95 de *P. salmonis*.
- P1hA-LF<sub>5</sub>** : Muestra P1A-LF<sub>5</sub> hervida durante 5 min a baño maría.
- P1hA-SLGO<sub>5</sub>**: Muestra P1A-SLGO<sub>5</sub> hervida durante 5 min a baño maría.

- P2-LF\*** : Fracción precipitada o “pellet” resuspendida en PBS (pH 7,4), resultante de la centrifugación a 11.427 x g de la suspensión bacteriana LF\*.
- P2-SLGOβ** : Fracción precipitada o “pellet” resuspendida en PBS (pH 7,4), resultante de la centrifugación a 11.427 x g de la suspensión bacteriana SLGOβ.
- S2A-LF<sub>10</sub>** : Fracción sobrenadante (S2), subproducto del proceso de obtención de muestra final, de la segunda centrifugación (11.427 x g) del homogeneizado de ova de salmón del Atlántico (*S. salar*) desafiada durante 10 min a la cepa LF-89 de *P. salmonis*.
- S2A-LF<sub>60</sub>** : Fracción sobrenadante (S2), subproducto del proceso de obtención de muestra final, de la segunda centrifugación (11.427 x g) del homogeneizado de ova de salmón del Atlántico (*S. salar*) desafiada durante 60 min a la cepa LF-89 de *P. salmonis*.
- S2A-SLGO<sub>10</sub>**: Fracción sobrenadante (S2), subproducto del proceso de obtención de muestra final, de la segunda centrifugación (11.427 x g) del homogeneizado de ova de salmón del Atlántico (*S. salar*) desafiada durante 10 min a la cepa SLGO-95 de *P. salmonis*.
- S2A-SLGO<sub>60</sub>**: Fracción sobrenadante (S2), subproducto del proceso de obtención de muestra final, de la segunda centrifugación (11.427 x g) del homogeneizado de ova de salmón del Atlántico (*S. salar*) desafiada durante 60 min a la cepa SLGO-95 de *P. salmonis*.
- S2-LF\*** : Fracción sobrenadante, resultante de la centrifugación a 11.427 x g de la suspensión bacteriana LF\*.
- S2-SLGOβ** : Fracción sobrenadante, resultante de la centrifugación a 11.427 x g de la suspensión bacteriana SLGOβ.
- S2T-LF<sub>1</sub>** : Fracción sobrenadante (S2), subproducto del proceso de obtención de muestra final, de la segunda centrifugación (11.427 x g) del homogeneizado de ova de trucha arco iris (*O. mykiss*) desafiada durante 1 min a la cepa LF-89 de *P. salmonis*.
- S2T-LF<sub>3</sub>** : Fracción sobrenadante (S2), subproducto del proceso de obtención de muestra final, de la segunda centrifugación (11.427 x g) del homogeneizado de ova de trucha arco iris (*O. mykiss*) desafiada durante 3 min a la cepa LF-89 de *P. salmonis*.
- S2T-LF<sub>5</sub>** : Fracción sobrenadante (S2), subproducto del proceso de obtención de muestra final, de la segunda centrifugación (11.427 x g) del homogeneizado de ova de trucha arco iris (*O. mykiss*) desafiada durante 5 min a la cepa LF-89 de *P. salmonis*.
- S2T-LF<sub>10</sub>** : Fracción sobrenadante (S2), subproducto del proceso de obtención de muestra final, de la segunda centrifugación (11.427 x g) del homogeneizado de ova de trucha arco iris (*O. mykiss*) desafiada durante 10 min a la cepa LF-89 de *P. salmonis*.

- S2T-LF<sub>30</sub>** : Fracción sobrenadante (S2), subproducto del proceso de obtención de muestra final, de la segunda centrifugación (11.427 x g) del homogeneizado de ova de trucha arco iris (*O. mykiss*) desafiada durante 30 min a la cepa LF-89 de *P. salmonis*.
- S2T-LF<sub>60</sub>** : Fracción sobrenadante (S2), subproducto del proceso de obtención de muestra final, de la segunda centrifugación (11.427 x g) del homogeneizado de ova de trucha arco iris (*O. mykiss*) desafiada durante 60 min a la cepa LF-89 de *P. salmonis*.
- S2T-SLGO<sub>1</sub>** : Fracción sobrenadante (S2), subproducto del proceso de obtención de muestra final, de la segunda centrifugación (11.427 x g) del homogeneizado de ova de trucha arco iris (*O. mykiss*) desafiada durante 1 min a la cepa SLGO-95 de *P. salmonis*.
- S2T-SLGO<sub>3</sub>** : Fracción sobrenadante (S2), subproducto del proceso de obtención de muestra final, de la segunda centrifugación (11.427 x g) del homogeneizado de ova de trucha arco iris (*O. mykiss*) desafiada durante 3 min a la cepa SLGO-95 de *P. salmonis*.
- S2T-SLGO<sub>5</sub>** : Fracción sobrenadante (S2), subproducto del proceso de obtención de muestra final, de la segunda centrifugación (11.427 x g) del homogeneizado de ova de trucha arco iris (*O. mykiss*) desafiada durante 5 min a la cepa SLGO-95 de *P. salmonis*.
- S2T-SLGO<sub>10</sub>** : Fracción sobrenadante (S2), subproducto del proceso de obtención de muestra final, de la segunda centrifugación (11.427 x g) del homogeneizado de ova de trucha arco iris (*O. mykiss*) desafiada durante 10 min a la cepa SLGO-95 de *P. salmonis*.
- S2T-SLGO<sub>30</sub>** : Fracción sobrenadante (S2), subproducto del proceso de obtención de muestra final, de la segunda centrifugación (11.427 x g) del homogeneizado de ova de trucha arco iris (*O. mykiss*) desafiada durante 30 min a la cepa SLGO-95 de *P. salmonis*.
- S2T-SLGO<sub>60</sub>** : Fracción sobrenadante (S2), subproducto del proceso de obtención de muestra final, de la segunda centrifugación (11.427 x g) del homogeneizado de ova de trucha arco iris (*O. mykiss*) desafiada durante 60 min a la cepa SLGO-95 de *P. salmonis*.
- SLGO $\beta$**  : Suspensión bacteriana obtenida a partir del sobrenadante, filtrado a 5 $\mu$ , de una botella de cultivo celular (pasaje 10) con un efecto citopático (ECP) cercano al 80% e infectada con la cepa SLGO-95 de *P. salmonis*. Esta suspensión fue la usada en el desafío principal de ovas de las dos especies salmónídeas con las cepas de *P. salmonis*, y se usó como control positivo del “dot-blot”.
- T-LF<sub>1</sub>** : Muestra final proveniente de una ova de trucha arco iris (*O. mykiss*) desafiada durante 1 min a la cepa LF-89 de *P. salmonis*.
- T-LF<sub>3</sub>** : Muestra final proveniente de una ova de trucha arco iris (*O. mykiss*) desafiada durante 3 min a la cepa LF-89 de *P. salmonis*.

- T-LF<sub>5</sub>** : Muestra final proveniente de una ova de trucha arco iris (*O. mykiss*) desafiada durante 5 min a la cepa LF-89 de *P. salmonis*.
- T-LF<sub>10</sub>** : Muestra final proveniente de una ova de trucha arco iris (*O. mykiss*) desafiada durante 10 min a la cepa LF-89 de *P. salmonis*.
- T-LF<sub>30</sub>** : Muestra final proveniente de una ova de trucha arco iris (*O. mykiss*) desafiada durante 30 min a la cepa LF-89 de *P. salmonis*.
- T-LF<sub>60</sub>** : Muestra final proveniente de una ova de trucha arco iris (*O. mykiss*) desafiada durante 60 min a la cepa LF-89 de *P. salmonis*.
- T-LFm<sub>5</sub>** : Muestra final proveniente de una ova de trucha arco iris (*O. mykiss*) desafiada durante 5 min a una suspensión bacteriana muerta de la cepa LF-89 de *P. salmonis*, usada como control negativo de la infección de ovas.
- T-LFm<sub>30</sub>** : Muestra final proveniente de una ova de trucha arco iris (*O. mykiss*) desafiada durante 30 min a una suspensión bacteriana muerta de la cepa LF-89 de *P. salmonis*, usada como control negativo de la infección de ovas.
- T-MEM<sub>5</sub>** : Muestra final proveniente de una ova de trucha arco iris (*O. mykiss*) incubada durante 5 min a una suspensión de medio esencial mínimo (MEM), usada como control negativo para el “dot-blot”.
- T-MEM<sub>60</sub>** : Muestra final proveniente de una ova de trucha arco iris (*O. mykiss*) incubada durante 60 min a una suspensión de medio esencial mínimo (MEM), usada como control negativo para el “dot-blot”.
- T-SLGO<sub>1</sub>** : Muestra final proveniente de una ova de trucha arco iris (*O. mykiss*) desafiada durante 1 min a la cepa SLGO-95 de *P. salmonis*.
- T-SLGO<sub>3</sub>** : Muestra final proveniente de una ova de trucha arco iris (*O. mykiss*) desafiada durante 3 min a la cepa SLGO-95 de *P. salmonis*.
- T-SLGO<sub>5</sub>** : Muestra final proveniente de una ova de trucha arco iris (*O. mykiss*) desafiada durante 5 min a la cepa SLGO-95 de *P. salmonis*.
- T-SLGO<sub>10</sub>** : Muestra final proveniente de una ova de trucha arco iris (*O. mykiss*) desafiada durante 10 min a la cepa SLGO-95 de *P. salmonis*.
- T-SLGO<sub>30</sub>** : Muestra final proveniente de una ova de trucha arco iris (*O. mykiss*) desafiada durante 30 min a la cepa SLGO-95 de *P. salmonis*.
- T-SLGO<sub>60</sub>** : Muestra final proveniente de una ova de trucha arco iris (*O. mykiss*) desafiada durante 60 min a la cepa SLGO-95 de *P. salmonis*.
- T-SLGOm<sub>5</sub>** : Muestra final proveniente de una ova de trucha arco iris (*O. mykiss*) desafiada durante 5 min a una suspensión bacteriana muerta de la cepa SLGO-95 de *P. salmonis*, usada como control negativo de la infección de ovas.
- T-SLGOm<sub>30</sub>** : Muestra final proveniente de una ova de trucha arco iris (*O. mykiss*) desafiada durante 30 min a una suspensión bacteriana muerta de la cepa SLGO-95 de *P. salmonis*, usada como control negativo de la infección de ovas.

## 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.* 49:33-38.
- ALMENDRAS, F.E.; FUENTEALBA, I.C.; JONES, S.R.M.; MARKHAM, F.; SPANGLER, E.** 1997. Experimental infection and horizontal transmission of *Piscirickettsia salmonis* in freshwater-raised Atlantic salmon, *Salmo salar*. *J. Fish Dis.* 20(6):409-418.
- ALVARADO, V.; SCHÄFER, J. W.; ENRÍQUEZ, R.; MONRÁS, M.; CUBILLOS, V.; FARIÁS, C.; ALBERDI, A.** 1990. Síndrome del salmón coho (S.S.C.), nueva enfermedad de salmonídeos cultivados en fase de agua de mar en Chile. Situación actual. *Patología Animal* 4:10-13.
- 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.; WINTON, 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. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España. 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.; 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.
- BUSTOS, P.; ENTRALA, P.; MONTAÑA, J.; CALBUYAHUE, J.** 1994. Septicemia rickettsial salmonidea (SRS): Estudio de transmisión vertical en salmón coho, *Oncorhynchus kisutch*. **In:** Patología y Nutrición en el Desarrollo de la Acuicultura. Puerto Montt, Chile. 3-7 octubre 1994.
- COMPS, M.; TRINDADE, M.; DELSERT, C.** 1996. Investigation of fish encephalitis virus (FEV) expression in marine fish using DIG-labeled probes. *Aquaculture.* 143(2):113-121.

- CORREAL, P.** 1995. Prospección de *Piscirickettsia salmonis* en fauna marina silvestre asociada al cultivo intensivo de salmónidos. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. 62 p.
- CVITANICH, J.; GÁRATE, O.; SMITH, C.E.** 1991. The isolation of a rickettsia-like organism causing disease and mortality in Chilean salmonids and its confirmation by Koch's postulate. *J. Fish Dis.* 14:121-145.
- FRYER, J.L.; LANNAN, C.N.; GARCÉS, L.H.; LARENAS, J.J.; SMITH, P.A.** 1990. Isolation of a rickettsiales-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.; LANNAN, C.N.** 1993. The history and current status of *Renibacterium salmoninarum*, the causative agent of bacterial kidney disease in Pacific salmon. *Fish. Res.* 17:15-33.
- FRYER, J.L.; LANNAN, C.N.** 1994. Rickettsial and chlamydial infections of freshwater and marine fishes, bivalves, and crustaceans. *Zool. Stud.* 33:95-105.
- FRYER, J.L.; MAUEL, M.J.** 1997. The rickettsia: an emerging group of pathogens in fish. *Emerging Infect. Dis.* 3(2):137-44.
- FRYER, J.L.; HEDRICK, R.P.** 2003. *Piscirickettsia salmonis*: a Gram-negative intracellular bacterial pathogen of fish. *J. Fish Dis.* 26(5):251-262.
- 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.
- GRAUMANN, R.; ENRIQUEZ, R.; MONRAS, M.; BROWN, A.W.; ROSENTHAL, H.** 1997. Experimental challenge of *Piscirickettsia salmonis* in postsmolts of Atlantic salmon (*Salmo salar*). **In:** VIII International Conference Diseases of Fish and Shellfish. Abstracts Book. Heriot-Watt University, Edinburgh. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* P-055.
- HOUSE, M.L.; BARTHOLOMEW, J.L.; WINTON, J.R.; FRYER, J.L.** 1999. Relative virulence of three isolates of *Piscirickettsia salmonis* for coho salmon *Oncorhynchus kisutch*. *Dis. Aquat. Org.* 35:107-113.
- JAMETT, A.; AGUAYO, J.; MIQUEL, A.; MULLER, I.; ARRIAGADA, R.; BECKER, M. I.; VALENZUELA, P.; BURZIO, O.** 2001. Characteristics of monoclonal antibodies against *Piscirickettsia salmonis*. *J. Fish Dis.* 24:205-215.

- JONES, S.R.M.; MARKHAM, R.J.F.; GROMAN, D.B.; CUSACK, R.R.** 1998. Virulence and antigenic characteristics of a cultured rickettsiales-like organism isolated from farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) in eastern Canada. *Dis. Aquat. Org.* 33:25-31.
- 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.
- LANNAN, C.; FRYER, J.** 1991. Recommended method for inspection of fish for the salmonid rickettsia. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* 11:135-136.
- LANNAN, C.N.; FRYER, J.L.** 1994. Extracellular survival of *Piscirickettsia salmonis*. *J. Fish Dis.* 17(5):545-548.
- LARENAS, J.; HIDALGO, L.; GARCÉS, H.; FRYER, J.; SMITH, P.** 1995. Piscirickettsiosis: lesiones en salmón del Atlántico (*Salmo salar*) infectados naturalmente con *Piscirickettsia salmonis*. *Av. Cienc. Vet.* 10:53-58.
- LARENAS, J.; ASTORGA, C.; CONTRERAS, J.; GARCÉS, H.; FRYER, J.L.; SMITH, P.** 1996a. Rapid detection of *Piscirickettsia salmonis* using microwave irradiation. *Fish Pathol.* 31(4):231-232.
- LARENAS, J.; ASTORGA, C.; CONTRERAS, J.; SMITH, P.** 1996b. Detección de *Piscirickettsia salmonis* en ovas fertilizadas provenientes de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) experimentalmente infectados. *Arch. Med. Vet.* 28:161-166.
- LARENAS, J.; CONTRERAS, J.; OYANEDEL, S.; MORALES, M. A.; SMITH, P.** 1997. Efecto de la densidad poblacional y temperatura en truchas arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) inoculadas con *Piscirickettsia salmonis*. *Arch. Med. Vet.* 29:113-119.
- LARENAS, J.; BARTHOLOMEW, J.; TRONCOSO, O.; FERNANDEZ, S.; LEDEZMA, H.; SANDOVAL, N.; VERA, P.; CONTRERAS, J.; SMITH, P.** 2003. Experimental vertical transmission of *Piscirickettsia salmonis* and *in vitro* study of attachment and mode of entrance into the fish ovum. *Dis. Aquat. Org.* 56:25-30.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. H.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J.** 1951. Protein measurement with the folin's phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
- MARSHALL, S.; HEATH, S.; HENRIQUEZ, V.; ORREGO, C.** 1998. Minimally invasive detection of *Piscirickettsia salmonis* in cultivated salmonids via the PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 64(8):3066-3069.

- MAUEL, N.J.; GIOVANNI, S.J.; FRYER, J.L.** 1996. Development of polymerase chain reaction assays for detection, identification, and differentiation of *Piscirickettsia salmonis*. Dis. Aquat. Org. 26:189-195.
- ÖZEL, M.; SCHWANZ-PFITZNER, I.** 1975. Comparative studies by the electron microscope of rhabdoviruses of plant and of animal origin. III. Egtved virus (VHS) of the rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and rickettsia-like organisms (author's transl). Zentralbl Bakteriol [Orig]. 230(1):1-14.
- QUINTEROS, J.** 2005. Comparación en la presentación del complejo de adhesión piscirickettsial entre dos cepas de *Piscirickettsia salmonis*. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. 54 p.
- SALINAS, G.; CONTRERAS, J.; SMITH, P.; LARENAS, J.** 1997. Horizontal transmission and excretion of *Piscirickettsia salmonis* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in fresh water condition. **In:** VIII International Conference Diseases of Fish and Shellfish. Abstracts Book. Heriot-Watt University, Edinburgh, Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol. P-057.
- SCHÄFER, J.; ALVARADO, V.; ENRÍQUEZ, R.; MONRÁS, M.** 1990. The coho salmon syndrome (CSS): A new disease in Chilean salmon, reared in sea water. Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol. 10:130.
- SMITH, P.A.; LANNAN, C.N.; GARCÉS, L.H.; JARPA, M.; LARENAS, J.; CASWELL-RENO, P.; WHIPPLE, M.; FRYER, J.L.** 1995. Piscirickettsiosis: A bacterin field trial in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol. 15:137-141.
- SMITH, P.; CONTRERAS, J.; GARCÉS, H.; LARENAS, J.; OYANEDEL, S.; CASWELL-RENO, P.; FRYER, J.** 1996a. Experimental challenge of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with *Piscirickettsia salmonis*. J. Aquat. Anim. Health 8:130-134.
- SMITH, P.A.; VECCHIOLA, I.M.; OYANEDEL, S.; GARCÉS, L.H.; LARENAS, J.; CONTRERAS, J.** 1996b. Antimicrobial sensitivity of four isolates of *Piscirickettsia salmonis*. Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol. 16(5):164-168.
- SMITH, P.A.; CONTRERAS, J.R.; LARENAS, J.J.; AGUILLON, J.C.; GARCÉS, 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.

**VENEGAS, C.** 1996. *Piscirickettsia salmonis*: Prospección en fauna marina asociada a cultivos de salmónidos infectados. Periodo invierno-primavera. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile, Universidad de Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. 95 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. Por cada ova a homogeneizar se necesitó 1 mL de la solución de homogeneizado. Como ejemplo, en el desafío principal de ovas se procesaron 18 ovas de cada especie, en la tabla 17 se muestra como se preparó 36 mL de solución de homogeneizado.

**Tabla 17.** Volúmenes y reactivos necesarios para preparar 36 mL de solución de homogeneizado, suficientes para procesar las ovas usadas en el desafío principal de ovas de dos especies salmonídeas con *Piscirickettsia salmonis*.

| Reactivos                                   | Proporción | Volúmenes |
|---|------------|-----------|
| “Buffer” de homogeneización                 | 1/1        | 36 mL     |
| Pepstation 2 mM                             | 1 µL/mL    | 36 µL     |
| Leupeptin 1 mM                              | 1 µL/mL    | 36 µL     |
| Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1 mM | 4 µL/20 mL | 7,2 µL    |

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

### B.- Obtención de muestra final para uso en “dot-blot”

Luego del proceso de homogeneizado se colocó los tubos que contenían las muestras dentro de la centrifuga para ser centrifugados a 1.208 x g durante 20 min 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 (S1), la cuál se extrajo mediante el uso de micropipeta en una cantidad de 800 µL y se traspasó a un tubo eppendorf® debidamente rotulado. Estos tubos eppendorf® se centrifugaron a 11.427 x g durante 60 min a 4° C. Producto de esta centrifugación cada muestra se dividió en dos

fracciones, una correspondiente al sobrenadante (S2) y la otra correspondiente a estructuras que precipitaron por esta última centrifugación (P2), a la que llamamos “pellet”. Para obtener la muestra definitiva, o muestra final, para el uso en la metodología “dot-blot” se usó la fracción P2 de la segunda centrifugación, la cuál se resuspendió en 150 µL de PBS pH 7,4.

### **C.- Metodología “dot-blot”**

#### PROTOCOLO

##### Primer día

1. Colocar la membrana de polivinildifluoruro (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 PVDF 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

1. Lavar la membrana PVDF con TBS 1X Tween 20 por 10 min en un agitador, en tres oportunidades.
2. 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.
3. Lavar la membrana PVDF con TBS 1X Tween 20 por 10 min en un agitador, en tres oportunidades.
4. 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.

5. Lavar la membrana PVDF con TBS 1X Tween 20 por 10 min en un agitador, en tres oportunidades.
6. Colocar la membrana en contacto con el sustrato que reacciona con la peroxidasa del segundo anticuerpo (SuperSignal<sup>®</sup> “west dura extended duration substrate”, Pierce<sup>®</sup>) en una capa fina por un tiempo de 5 a 10 min.
7. Poner la membrana en contacto con una película fotosensible (CL-X Posure<sup>®</sup>, Pierce<sup>®</sup>) dentro de un casete de exposición (“Exposure casete, vinyl-covered with Velcro<sup>®</sup> closure for 8x10 in film”, Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) por 2 a 8 min.
8. Revelar la película.
9. Evaluar mediante densitometría usando software computacional (“Un-Scan-It”, versión 4.1, 1996).

## ANEXO 2

### A.- Cantidad de proteína total en muestras usadas y respectivos resultados en experiencias “dot-blot”

#### A.1- Proteína total de muestras de la primera experiencia y sus resultados al “dot-blot”

**Tabla 18.** Cantidad total de proteínas presente en las muestras provenientes del primer desafío<sup>1</sup>, ovas de salmón del Atlántico (*Salmo salar*) desafiadas con la cepa SLGO-95 de *Piscirickettsia salmonis*, usadas en la primera experiencia<sup>2</sup> “dot-blot”.

| Muestras <sup>3</sup> | μL de muestra | μg prot./ μL muestra | μg totales prot. / muestra | Resultado al “dot-blot” |
|-----------------------|---------------|----------------------|----------------------------|-------------------------|
| SLGO <sub>1</sub>     | 30 μL         | 8,24                 | 247,2                      | -                       |
| SLGO <sub>3</sub>     | 30 μL         | 7,60                 | 228,0                      | -                       |
| SLGO <sub>5</sub>     | 30 μL         | 6,24                 | 187,2                      | -                       |
| SLGO <sub>10</sub>    | 30 μL         | 12,33                | 369,9                      | -                       |
| SLGO <sub>30</sub>    | 30 μL         | 10,33                | 309,9                      | -                       |
| SLGO <sub>60</sub>    | 30 μL         | 4,73                 | 141,9                      | -                       |
| SLGOM <sub>5</sub>    | 30 μL         | ND                   | ND                         | ND                      |
| SLGOM <sub>30</sub>   | 30 μL         | 9,73                 | 291,9                      | -                       |
| MEM <sub>5</sub>      | 30 μL         | ND                   | ND                         | ND                      |
| MEM <sub>60</sub>     | 30 μL         | 2,38                 | 71,4                       | -                       |
| SLGO <sub>α</sub>     | 30 μL         | 4,81                 | 144,3                      | +                       |
| SLGO*                 | 30 μL         | 4,99                 | 149,7                      | +                       |
| LF*                   | 30 μL         | 7,14                 | 214,2                      | +                       |
| S2-SLGO*              | 30 μL         | 5,22                 | 156,6                      | +                       |
| P2-SLGO*              | 30 μL         | 1,03                 | 30,9                       | +                       |

1. Primer desafío; desafío de ovas de salmón del Atlántico (*S. salar*) con la cepa SLGO-95 de *P. salmonis*.

2. Primera experiencia; experimentos realizados a partir de muestras de ovas de salmón del Atlántico (*S. salar*) teóricamente infectadas con la cepa SLGO-95 de *P. salmonis*.

3. Nomenclaturas;

- SLGO<sub>1</sub>, SLGO<sub>3</sub>, SLGO<sub>5</sub>, SLGO<sub>10</sub>, SLGO<sub>30</sub> y SLGO<sub>60</sub> corresponden a las muestras finales de los homogeneizados de ovas de salmón del Atlántico (*S. salar*) desafiadas, durante 1, 3, 5, 10, 30 y 60 min respectivamente, con la cepa SLGO-95 de *P. salmonis*.

- SLGOM<sub>5</sub> y SLGOM<sub>30</sub> corresponden a las muestras finales de los homogeneizados de ovas de salmón del Atlántico (*S. salar*) desafiadas, durante 5 y 30 min respectivamente, con una suspensión de la cepa SLGO-95 de *P. salmonis* muerta.

- MEM<sub>5</sub> y MEM<sub>60</sub> corresponden a las muestras finales de los homogeneizados de ovas de salmón del Atlántico (*S. salar*) incubadas, durante 5 y 60 min respectivamente, con una suspensión de medio esencial mínimo suplementado al 10% con suero fetal bovino (MEM-10).

- SLGO<sub>α</sub> corresponde a la suspensión bacteriana de la cepa SLGO-95 de *P. salmonis* usada en el primer desafío de ovas, mientras que SLGO\* corresponde a la suspensión de la misma cepa bacteriana obtenida a partir de una botella de cultivo celular distinta. S2-SLGO\* y P2-SLGO\* son fracciones resultantes de la centrifugación a 11.247 x g de la suspensión SLGO\*.

- LF\* corresponde a una suspensión bacteriana de la cepa LF-89 de *P. salmonis* usada durante la estandarización del método “dot-blot” (Gatica, 2007).

ND. No determinado.

## A.2- Proteína total de muestras de la segunda experiencia y sus resultados al “dot-blot”

**Tabla 19.** Cantidad total de proteínas presente en las muestras provenientes del desafío principal<sup>1</sup>, ovas de salmón del Atlántico (*Salmo salar*) desafiadas con dos cepas de *Piscirickettsia salmonis* (SLGO-95 y LF-89), usadas en la segunda experiencia<sup>2</sup> “dot-blot”.

| Muestras <sup>3</sup>  | µL de muestra | µg prot./ µL muestra | µg totales prot. / muestra | Resultado al “dot-blot” |
|------------------------|---------------|----------------------|----------------------------|-------------------------|
| A-SLGO <sub>1</sub>    | 30 µL         | 0,02                 | 0,6                        | -                       |
| A-SLGO <sub>3</sub>    | 30 µL         | 0,08                 | 2,4                        | -                       |
| A-SLGO <sub>5</sub>    | 30 µL         | 0,71                 | 21,3                       | -                       |
| A-SLGO <sub>10</sub>   | 30 µL         | 0,71                 | 21,3                       | -                       |
| A-SLGO <sub>30</sub>   | 30 µL         | 0,77                 | 23,1                       | -                       |
| A-SLGO <sub>60</sub>   | 30 µL         | 0,91                 | 27,3                       | -                       |
| A-SLGOm <sub>5</sub>   | 30 µL         | 0,0 <sup>4</sup>     | 0,0 <sup>4</sup>           | -                       |
| A-SLGOm <sub>30</sub>  | 30 µL         | 0,0 <sup>4</sup>     | 0,0 <sup>4</sup>           | -                       |
| A-MEM <sub>5</sub>     | 30 µL         | 0,01                 | 0,3                        | -                       |
| A-MEM <sub>60</sub>    | 30 µL         | 0,0 <sup>4</sup>     | 0,0 <sup>4</sup>           | -                       |
| A-LF <sub>1</sub>      | 30 µL         | 0,0 <sup>4</sup>     | 0,0 <sup>4</sup>           | -                       |
| A-LF <sub>3</sub>      | 30 µL         | 0,21                 | 6,3                        | -                       |
| A-LF <sub>5</sub>      | 30 µL         | 0,04                 | 1,2                        | -                       |
| A-LF <sub>10</sub>     | 30 µL         | 0,01                 | 0,3                        | -                       |
| A-LF <sub>30</sub>     | 30 µL         | 0,07                 | 2,1                        | -                       |
| A-LF <sub>60</sub>     | 30 µL         | 0,36                 | 10,8                       | +                       |
| A-LFm <sub>5</sub>     | 30 µL         | 0,21                 | 6,3                        | -                       |
| A-LFm <sub>30</sub>    | 30 µL         | 0,15                 | 4,5                        | -                       |
| S2A-SLGO <sub>10</sub> | 30 µL         | 1,13                 | 33,9                       | +                       |
| S2A-SLGO <sub>60</sub> | 30 µL         | 1,26                 | 37,8                       | +                       |
| S2A-LF <sub>10</sub>   | 30 µL         | 1,19                 | 35,7                       | +                       |
| S2A-LF <sub>60</sub>   | 30 µL         | 1,33                 | 39,9                       | +                       |
| SLGOβ                  | 30 µL         | 4,88                 | 146,4                      | +                       |
| LF                     | 30 µL         | 5,33                 | 159,9                      | +                       |
| LF*                    | 30 µL         | 7,14                 | 214,2                      | +                       |

1. Desafío principal; desafío de ovas de dos especies de salmónidos (salmón del Atlántico y trucha arco iris) con dos cepas de *P. salmonis* (SLGO-95 y LF-89).

2. Segunda experiencia; experimentos realizados a partir de muestras de ovas de salmón del Atlántico (*S. salar*) teóricamente infectadas con dos cepas de *Piscirickettsia salmonis*.

3. Nomenclaturas;

- A-SLGO<sub>1</sub>, A-SLGO<sub>3</sub>, A-SLGO<sub>5</sub>, A-SLGO<sub>10</sub>, A-SLGO<sub>30</sub> y A-SLGO<sub>60</sub> corresponden a las muestras finales de los homogeneizados de ovas de salmón del Atlántico (*S. salar*) desafiadas, durante 1, 3, 5, 10, 30 y 60 min respectivamente, con la cepa SLGO-95 de *P. salmonis*. A-SLGOm<sub>5</sub> y A-SLGOm<sub>30</sub> corresponden a las muestras finales de los homogeneizados de ovas de salmón del Atlántico (*S. salar*) desafiadas, durante 5 y 30 min respectivamente, con una suspensión de la cepa SLGO-95 de *P. salmonis* muerta.

- A-MEM<sub>5</sub> y A-MEM<sub>60</sub> corresponden a las muestras finales de los homogeneizados de ovas de salmón del Atlántico (*S. salar*) incubadas, durante 5 y 60 min respectivamente, con una suspensión de medio esencial mínimo (MEM).

- S2A-SLGO<sub>10</sub>, S2A-SLGO<sub>60</sub>, S2A-LF<sub>10</sub> y S2A-LF<sub>60</sub> corresponden a las fracciones sobrenadantes (S2) resultantes del proceso de centrifugación a 11.427 x g del homogeneizado de ovas que originaron a las muestras A-SLGO<sub>10</sub>, A-SLGO<sub>60</sub>, A-LF<sub>10</sub> y A-LF<sub>60</sub>, respectivamente.

- A-LF<sub>1</sub>, A-LF<sub>3</sub>, A-LF<sub>5</sub>, A-LF<sub>10</sub>, A-LF<sub>30</sub> y A-LF<sub>60</sub> corresponden a las muestras finales de los homogeneizados de ovas de salmón del Atlántico (*S. salar*) desafiadas, durante 1, 3, 5, 10, 30 y 60 min respectivamente, con la cepa LF-89 de *P. salmonis*. A-LFm<sub>5</sub> y A-LFm<sub>30</sub> corresponden a las muestras finales de los homogeneizados de ovas de salmón del Atlántico (*S. salar*) desafiadas, durante 5 y 30 min respectivamente, con una suspensión de la cepa LF-89 de *P. salmonis* muerta.
  - SLGOβ corresponde a la suspensión bacteriana de la cepa SLGO-95 de *P. salmonis* usada en el desafío principal de ovas, mientras que LF corresponde a la suspensión de la cepa LF-89 usada en el mismo desafío.
  - LF\* corresponde a una suspensión bacteriana de la cepa LF-89 de *P. salmonis* usada durante la estandarización del método “dot-blot” (Gatica, 2007)
4. Los valores de absorbancia de estas muestras se encontraban por debajo de la curva de calibración, lo que generó valores de proteína negativos.

### A.3- Proteína total de muestras de la tercera experiencia y sus resultados al “dot-blot”

A las muestras finales generadas a partir del homogeneizado de ovas de trucha arco iris (*O. mykiss*) incubadas con las cepas SLGO-95 (T-SLGO<sub>1</sub>, T-SLGO<sub>3</sub>, T-SLGO<sub>5</sub>, T-SLGO<sub>10</sub>, T-SLGO<sub>30</sub> y T-SLGO<sub>60</sub>) y LF-89 (T-LF<sub>1</sub>, T-LF<sub>3</sub>, T-LF<sub>5</sub>, T-LF<sub>10</sub>, T-LF<sub>30</sub> y T-LF<sub>60</sub>) de *P. salmonis* durante el desafío principal, y a los controles negativos de infección (T-MEM<sub>5</sub>, T-MEM<sub>60</sub>, T-SLGOm<sub>5</sub>, T-SLGOm<sub>30</sub>, T-LFm<sub>5</sub> y T-LFm<sub>30</sub>), no les fue determinada la cantidad de proteína presente. Si fue determinada la cantidad de proteína en las muestras S2 originadas durante la obtención de las muestras finales (tabla 20).

**Tabla 20.** Cantidad total de proteínas presente en las muestras provenientes del desafío principal<sup>1</sup>, ovas de trucha arco iris (*O. mykiss*) desafiadas con dos cepas de *Piscirickettsia salmonis* (SLGO-95 y LF-89), usadas en la tercera experiencia<sup>2</sup> “dot-blot”.

| Muestras <sup>3</sup>   | μL de muestra | μg prot./ μL muestra | μg totales prot. / muestra | Resultado al “dot-blot” |
|-------------------------|---------------|----------------------|----------------------------|-------------------------|
| S2T-SLGO <sub>1</sub>   | 30            | 0,59                 | 17,7                       | -                       |
|                         | 60            |                      | 35,4                       | -                       |
| S2T-SLGO <sub>3</sub>   | 30            | 0,74                 | 22,2                       | -                       |
|                         | 60            |                      | 44,4                       | -                       |
| S2T-SLGO <sub>5</sub>   | 30            | 0,58                 | 17,4                       | -                       |
|                         | 60            |                      | 34,8                       | -                       |
| S2T-SLGO <sub>10</sub>  | 30            | 0,60                 | 18,0                       | -                       |
|                         | 60            |                      | 36,0                       | -                       |
| S2T-SLGO <sub>30</sub>  | 30            | 0,37                 | 11,1                       | -                       |
|                         | 60            |                      | 22,2                       | -                       |
| S2T-SLGO <sub>60</sub>  | 30            | 0,51                 | 15,3                       | -                       |
|                         | 60            |                      | 30,6                       | -                       |
| S2T-SLGOm <sub>5</sub>  | 30            | 0,11                 | 3,3                        | -                       |
|                         | 60            |                      | 6,6                        | -                       |
| S2T-SLGOm <sub>30</sub> | 30            | 0,21                 | 6,3                        | -                       |
|                         | 60            |                      | 12,6                       | -                       |
| S2T-MEM <sub>5</sub>    | 30            | 0,13                 | 3,9                        | -                       |
|                         | 60            |                      | 7,8                        | -                       |

|                       |    |      |       |     |
|-----------------------|----|------|-------|-----|
| S2T-MEM <sub>60</sub> | 30 | 0,09 | 2,7   | -   |
|                       | 60 |      | 5,4   | -   |
| S2T-LF <sup>1</sup>   | 30 | 0,86 | 25,8  | -   |
|                       | 60 |      | 51,6  | -   |
| S2T-LF <sub>3</sub>   | 30 | 0,45 | 13,5  | -   |
|                       | 60 |      | 27,0  | -   |
| S2T-LF <sub>5</sub>   | 30 | 0,62 | 18,6  | -   |
|                       | 60 |      | 37,2  | -   |
| S2T-LF <sub>10</sub>  | 30 | 0,85 | 25,5  | -   |
|                       | 60 |      | 51,0  | -   |
| S2T-LF <sub>30</sub>  | 30 | 0,54 | 16,2  | -   |
|                       | 60 |      | 32,4  | -   |
| S2T-LF <sub>60</sub>  | 30 | 0,68 | 20,4  | -   |
|                       | 60 |      | 40,8  | -   |
| SLGO $\beta$          | 15 | 4,88 | 73,2  | (+) |
|                       | 30 |      | 146,4 | (+) |
| LF                    | 15 | 5,33 | 80,0  | (+) |
|                       | 30 |      | 159,9 | (+) |

1. Desafío principal; desafío de ovas de dos especies de salmónidos (salmón del Atlántico y trucha arco iris) con dos cepas de *P. salmonis* (SLGO-95 y LF-89).

2. Tercera experiencia; experimentos realizados a partir de muestras de ovas de trucha arco iris (*O. mykiss*) teóricamente infectadas con dos cepas de *Piscirickettsia salmonis*.

3. Nomenclaturas;

- S2T-SLGO<sub>1</sub>, S2T-SLGO<sub>3</sub>, S2T-SLGO<sub>5</sub>, S2T-SLGO<sub>10</sub>, S2T-SLGO<sub>30</sub> y S2T-SLGO<sub>60</sub> corresponden a las fracciones sobrenadantes (S2) resultantes del proceso de obtención de muestras finales a partir de los homogeneizados de ovas de trucha arco iris (*O. mykiss*) desafiadas, durante 1, 3, 5, 10, 30 y 60 min respectivamente, con la cepa SLGO-95 de *P. salmonis*. S2T-SLGO<sub>m5</sub> y S2T-SLGO<sub>m30</sub> corresponden a las muestras finales de los homogeneizados de ovas de trucha arco iris (*O. mykiss*) desafiadas, durante 5 y 30 min respectivamente, con una suspensión de la cepa SLGO-95 de *P. salmonis* muerta.

- S2T-MEM<sub>5</sub> y S2T-MEM<sub>60</sub> corresponden a las muestras finales de los homogeneizados de ovas de trucha arco iris (*O. mykiss*) incubadas, durante 5 y 60 min respectivamente, con una suspensión de medio esencial mínimo (MEM).

- S2T-LF<sub>1</sub>, S2T-LF<sub>3</sub>, S2T-LF<sub>5</sub>, S2T-LF<sub>10</sub>, S2T-LF<sub>30</sub> y S2T-LF<sub>60</sub> corresponden a las fracciones sobrenadantes (S2) resultantes del proceso de obtención de muestras finales a partir de los homogeneizados de ovas de trucha arco iris (*O. mykiss*) desafiadas, durante 1, 3, 5, 10, 30 y 60 min respectivamente, con la cepa LF-89 de *P. salmonis*. S2T-LF<sub>m5</sub> y S2T-LF<sub>m30</sub> corresponden a las muestras finales de los homogeneizados de ovas de trucha arco iris (*O. mykiss*) desafiadas, durante 5 y 30 min respectivamente, con una suspensión de la cepa LF-89 de *P. salmonis* muerta.

- SLGO $\beta$  corresponde a la suspensión bacteriana de la cepa SLGO-95 de *P. salmonis* usada en el desafío principal de ovas, mientras que LF corresponde a la suspensión de la cepa LF-89 usada en el mismo desafío.