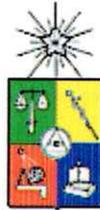


UCH - FC
Biotecnología
G 615
C. 1

ESCUELA DE PREGRADO - FACULTAD DE CIENCIAS - UNIVERSIDAD DE CHILE



“ANÁLISIS DEL CICLO REPLICATIVO DEL VIRUS DE LA ANEMIA INFECCIOSA DEL SALMÓN MEDIANTE ANTICUERPOS MONOCLONALES”

Memoria de Título entregada a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

BERTSY LENKA GOIĆ FIGUEROA



Director de Memoria de Título

Dr. Luis Burzio Eriz

Comisión de Evaluación de la Memoria de Título

Dr. Oscar León Decap
Presidente Comisión

Dr. Jonas Chnaiderman Figueroa



Santiago de Chile, 16 de Enero 2004



AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Pablo Valenzuela por creer en los alumnos.

Al Dr. Luis Burzio por su confianza, apoyo y guía que hicieron posible el desarrollo de este trabajo.

A la Dra. María Rosa Bono por sus valiosos consejos.

A Álvaro Miquel por su paciencia, consejos y por las horas dedicadas a mi entrenamiento.

A Adolfo Jamett, por su trabajo con los anticuerpos monoclonales, sin los cuales esta tesis no habría sido posible.

A Juan y Nicole, por su excelente disposición para responder mis dudas, entregar datos útiles que simplifican la vida y ponerle algo más de humor al trabajo diario (como todos los "niños de Inmuno").

A Juani, por su apoyo en el trabajo diario, por su amistad y calidez.

A toda la gente de BiosChile I.G.S.A., Fundación Ciencia para la Vida e Instituto Milenio, que no alcanzo a agradecer, pero que de una forma u otra hicieron posible la realización de mi tesis.

Mirna, Dani, Turbi, Mariela, Diani, Marlene...que les puedo decir, a uds. y todos mis compañeros y Amigos de la universidad, gracias por los años de amistad, paciencia, cariño y tantas cosas más, que lograron hacer mi paso por Juan Gómez Millas Inolvidable.

A Pablo Vargas, por ser el mejor amigo, por tener una paciencia inimaginable conmigo, por quererme tal cual soy y simplemente dejarme ser, pero por sobre todo, por hacer no sólo de los buenos momentos, sino también de los malos, tesoros que guardaré siempre conmigo.

A mis hermanos y abuelas por tanto cariño y “tantos” años de paciencia.

A Nicolás, por sus “sabios” consejos y momentos de felicidad increíbles. Por condimentar mi vida y sacar lo mejor de mí.

A mis padres, Eliana y Gustavo, por su amor y apoyo incondicional, por haberme dejado equivocarse y estar ahí para levantarme, por haber sabido guiarme silenciosamente, por millones de cosas que tal vez nunca sepa. Simplemente por ser ellos y ser yo.



ABREVIATURAS

AcMo: Anticuerpo monoclonal

BCIP: 5-Bromo 4-Cloro 3-indolil fosfato

DABCO: 1,4-diazabicyclo-[2,2,2]octano

DPI: Días post infección

CHSE: Chinook salmon embryo

CPE: Efecto citopático

ELISA: Ensayo inmunoenzimático en fase sólida

FAL: Fosfatasa alcalina

FITC: Fluoroceína isotiocianato

GKN: Amortiguador fosfato glucosado salino

HA: Hemaglutinina

HPI: Horas post infección

IFAT: Técnica de inmunofluorescencia indirecta

IFI: Inmunofluorescencia

IPNV: Virus de la necrosis pancreática infecciosa

ISAV: Virus de la anemia infecciosa del salmón

NA: Neuraminidasa

MHC-I: Complejo principal de histocompatibilidad de clase I

NBT: Azul nitro tetrazolium

ORF: Marco abierto de lectura

PBS: Solución salina de fosfato

PCR: Reacción de polimerización en cadena

PEG: Polietilenglicol

RNP: Ribonucleoproteína

SDS: Dodecil sulfato de sodio

SHK: Salmon head kidney

TBE: Tris borato EDTA

TCID₅₀: Dosis infectiva en cultivo 50% (Tissue culture infectious dose)

TE: Tris EDTA

TEMED: N, N, N', N'-tetrametiletilendiamina

Tris: Tris-(hidroximetil)-aminometano

TNE: Tris NaCl EDTA

vARN: ARN viral

RESUMEN

El virus de la anemia infecciosa del salmón, es un patógeno que ha causado una alta mortalidad en el hemisferio norte y que recientemente ha sido detectado en Chile. Este agente infeccioso es un virus de la familia de los orthomyxoviridae, los cuales son virus cubiertos que poseen un genoma consistente en 8 segmentos de ARN de hebra simple y polaridad negativa.

En el presente trabajo, se realizó un estudio de la biología del virus con el fin de establecer las bases para el desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico, control y prevención de esta enfermedad. Con este objetivo, se produjo un panel de anticuerpos monoclonales contra un aislado canadiense del virus de la anemia infecciosa del salmón, con los cuales fue posible realizar un seguimiento de la replicación viral en células CHSE-214 desde 5 horas hasta 10 días después de la infección. Usando estos anticuerpos y mediante inmunofluorescencia indirecta, se encontró que el virus presenta una fase nucleolar durante su replicación, lo cual constituye el primer hallazgo de esta naturaleza en esta familia viral. Por medio de hibridaciones *in situ*, empleando sondas sentido y antisentido dirigidas contra los segmentos 2 y 6 del genoma viral, fue posible detectar ARN viral en el nucleolo, lo que confirma los hallazgos obtenidos mediante inmunofluorescencia. Además de la señalización nucleolar, los anticuerpos permitieron detectar una señal que por su polaridad y morfología, correspondería al aparato de Golgi y otras señales observadas en el citoplasma podrían corresponder al centrosoma.

A través de inmunofluorescencias, los anticuerpos monoclonales reaccionaron positivamente con improntas de riñón, hígado y bazo de salmonídeos chilenos con

anemia e ictericia, lo cual sugiere que los anticuerpos producidos con el aislado canadiense serían capaces de reconocer algunas proteínas del "ISAV like", que aún no ha sido caracterizado.

SUMMARY

The infectious salmon anemia virus (ISAV) is a pathogen which has caused a high mortality in the northern hemisphere and recently it has been detected in Chile. The infectious agent is a virus belonging to the family of orthomyxoviridae, which are enveloped viruses containing a genome composed of 8 fragments of single strand negative RNA.

In this work some aspects of the virus biology were studied to establish the basis for the development of new methods of diagnostic, control and prevention of the disease. One of the objectives was to produce a panel of monoclonal antibodies against a canadian isolate of ISAV. With these antibodies it was possible to follow the viral replication in CHSE-214 cells from 5 hours to 10 days post-infection. By using indirect immunofluorescence it was found a nucleolar phase during the replication of the virus, which is the first observation of this nature in the orthomyxoviridae family. By means of *in situ* hybridization and using sense and antisense probes against segments 2 and 6 of the viral genome, it was possible to detect the viral RNA in the nucleolus, confirming the results of immunofluorescence. In addition, it was possible to detect immunoreactivity associated to a structure that because of its polarity and morphology, appears to be the Golgi complex. Also, another fluorescence signal observed in the cytoplasm might correspond to the centrosomes.

By using the monoclonal antibodies for indirect immunofluorescent assay with samples of kidney, liver and spleen of chilean salmonid fish with anemia and jaundice, detection of a ISAV-like virus was possible.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
AGRADECIMIENTOS	II
ABREVIATURAS	IV
RESUMEN.....	VI
SUMMARY	VIII
ÍNDICE GENERAL.....	IX
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XI
ÍNDICE DE TABLAS	XI
1 INTRODUCCIÓN	1
1.1 ASPECTOS GENERALES.....	1
1.2 CARACTERÍSTICAS DE LA ENFERMEDAD.....	2
1.3 CARACTERÍSTICAS DEL VIRUS.....	4
1.4 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO.....	10
1.5 TRANSMISIÓN DE LA ENFERMEDAD.....	11
1.6 TRATAMIENTO Y PROTECCIÓN.....	12
2 MATERIALES Y MÉTODOS	14
2.1 CULTIVO CELULAR.....	14
2.1.1 <i>Expansión de células CHSE-214</i>	14
2.1.2 <i>Propagación del ISAV</i>	14
2.1.3 <i>Cálculo de dosis infectiva en cultivo celular (TCID₅₀) para un lisado de ISAV</i>	15
2.1.3.a <i>Por visualización directa del efecto citopático (CPE)</i>	15
2.1.3.b <i>Mediante inmunofluorescencia indirecta</i>	16
2.1.4 <i>Clarificación del lisado</i>	16
2.1.5 <i>Enriquecimiento viral por medio de polietilenglicol 8.000 (PEG)</i>	17
2.1.6 <i>Purificación viral mediante gradiente de Ficoll</i>	17
2.1.7 <i>Concentración por ultracentrifugación</i>	18
2.2 ANTICUERPOS MONOCLONALES.....	19
2.2.1 <i>Obtención de anticuerpos monoclonales</i>	19
2.2.2 <i>Purificación de anticuerpos monoclonales</i>	20
2.2.3 <i>Especificidad de los anticuerpos monoclonales</i>	20
2.3 CARACTERIZACIÓN DEL ISAV.....	21
2.3.1 <i>Electroforesis en geles de poliacrilamida para proteínas</i>	21
2.3.2 <i>Western Blot</i>	22
2.3.3 <i>Amplificación del genoma viral mediante RT-PCR</i>	23
2.3.3.a <i>Aislamiento del ARN</i>	23
2.3.3.b <i>Síntesis de cADN</i>	23
2.3.3.c <i>Reacción en cadena de la polimerasa</i>	24
2.3.3.d <i>Visualización del producto de amplificación</i>	24

2.3.4	<i>Visualización de los segmentos genómicos del ISAV</i>	25
2.3.4.a	Gel de poliacrilamida para ácidos nucleicos.	25
2.3.4.b	Tinción con plata para ácidos nucleicos.....	26
2.3.5	<i>Inmunofluorescencias Indirectas</i>	26
2.4	HIBRIDACIÓN <i>IN SITU</i> (HIS).	27
2.4.1	<i>Diseño de sondas para HIS</i>	27
2.4.2	<i>Marcaje de sonda con digoxigenina</i>	28
2.4.3	<i>Tratamiento de cámara de cultivo con Pegotina</i>	29
2.4.4	<i>Hibridación in situ</i>	29
2.4.5	<i>Tinción de nucleolos</i>	30
3	RESULTADOS.....	31
3.1	ANTICUERPOS MONOCLONALES.	31
3.1.1	<i>Obtención de anticuerpos monoclonales</i>	31
3.2	PROPAGACIÓN DEL ISAV.....	32
3.3	AMPLIFICACIÓN DEL ARN VIRAL POR RT-PCR.....	36
3.4	CONCENTRACIÓN Y PURIFICACIÓN DEL VIRUS DE LA ANEMIA INFECCIOSA DEL SALMÓN.	38
3.4.1	<i>Concentración por PEG 8.000</i>	38
3.4.2	<i>Purificación en gradiente de Ficoll</i>	38
3.4.3	<i>Concentración por ultracentrifugación</i>	39
3.4.3.a	<i>Caracterización de los AcMos anti ISAV por Western blot</i>	40
3.5	ANÁLISIS DE LOS SEGMENTOS GENÓMICOS DEL ISAV.....	41
3.6	ANÁLISIS PRELIMINAR DEL CICLO REPLICATIVO DEL ISAV.	47
3.7	HIBRIDACIÓN <i>IN SITU</i> (HIS).	58
3.8	INMUNOREACTIVIDAD DE LOS AC MOS CON TEJIDOS DE SALMONÍDEOS CON SÍNDROME ICTÉRICO.....	61
4	DISCUSIÓN.....	64
5	CONCLUSIONES.	79
6	REFERENCIAS.....	80

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
FIGURA 1 ESQUEMA DE UN ORTHOMYXOVIRIDAE.....	4
FIGURA 2 CICLO REPLICATIVO DE LOS ORTHOMYXOVIRIDAE.....	5
FIGURA 3 CULTIVO DE ISAV EN CÉLULAS CHSE -214.....	33
FIGURA 4 DETERMINACIÓN DEL TCID ₅₀	34
FIGURA 5 ANÁLISIS DE TCID ₅₀ MEDIANTE AMPLIFICACIÓN DEL ARN VIRAL POR RT-PCR....	37
FIGURA 6 PROTEÍNAS VIRALES EN DISTINTAS ETAPAS DE LA CONCENTRACIÓN POR PEG.	42
FIGURA 7 PROTEÍNAS VIRALES DE ISAV PARCIALMENTE PURIFICADAS MEDIANTE SEDIMENTACIÓN CON GRADIENTE DE FICOLL.....	43
FIGURA 8 PROTEÍNAS VIRALES DE ISAV PARCIALMENTE PURIFICADAS MEDIANTE ULTRACENTRIFUGACIÓN.....	44
FIGURA 9 PROTEÍNAS DE ISAV RECONOCIDAS POR LOS ACMOS	45
FIGURA 10 ANÁLISIS DE LOS SEGMENTOS GENÓMICOS DEL ISAV.....	46
FIGURA 11 INMUNOFLUORESCENCIA DEL PANEL DE ACMOS ANTI ISAV.....	49
FIGURA 12 INMUNOFLUORESCENCIA DE CÉLULAS CHSE-214 CON ISAV.....	50
FIGURA 13 INMUNOFLUORESCENCIA GENERALIZADA EN CÉLULAS CHSE-214 INFECTADAS CON ISAV.....	51
FIGURA 14 LOCALIZACIÓN APARENTEMENTE CITOPASMÁTICA DE PROTEÍNAS DE ISAV EN CÉLULAS CHSE-214 INFECTADAS.....	52
FIGURA 15 LOCALIZACIÓN NUCLEAR DE PROTEÍNAS DE ISAV	53
FIGURA 16 LOCALIZACIÓN APARENTEMENTE NUCLEOLAR DE PROTEÍNAS DE ISAV.....	54
FIGURA 17 LOCALIZACIÓN APARENTEMENTE EN EL APARATO DE GOLGI DE PROTEÍNAS DE ISAV.....	55
FIGURA 18 LOCALIZACIÓN APARENTEMENTE EN LOS CENTROSOMAS DE PROTEÍNAS DE ISAV	56
FIGURA 19 LOCALIZACIÓN DE ALGUNOS SEGMENTOS DEL GENOMA DE ISAV.....	57
FIGURA 20 MORFOLOGÍA DEL NUCLEOLO DE CÉLULAS CHSE-214.....	60
FIGURA 21 INMUNOREACTIVIDAD EN RIÑÓN DE PECES CON SÍNDROME ICTÉRICO CON UNA MEZCLA OLIGOCLONAL DE ACMOS.....	62

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
TABLA 1 PROTEÍNAS DEL VIRUS DE LA ANEMIA INFECCIOSA DEL SALMÓN.....	8
TABLA 2 DETERMINACIÓN DE LA TCID ₅₀ EN BASE AL EFECTO CITOPÁTICO.....	35
TABLA 3 DETERMINACIÓN DE LA TCID ₅₀ MEDIANTE INMUNOFLUORESCENCIA.....	35
TABLA 4 TIPO DE SEÑALIZACIÓN EN EL SEGUIMIENTO DE LA INFECCIÓN.....	57
TABLA 5 PORCENTAJE DE INMUNOREACTIVIDAD NUCLEOLAR DE LOS AcMos 2C2/H7 Y 3G8/B10.....	57
TABLA 6 INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA DE IMPRONTAS DE RIÑONES DE PECES SANOS Y PECES CON SÍNDROME ICTÉRICO.....	63

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Aspectos generales.

De acuerdo con antecedentes proporcionados por organismos internacionales, los dos tercios del suministro mundial de pescado para la alimentación se obtienen de la pesca en aguas marinas, mientras que el tercio restante procede de la acuicultura (www.salmonchile.cl/sch/).

Si se examina el caso chileno, donde parte importante del desarrollo acuícola está representado por el sector salmonicultor, los resultados estadísticos son impresionantes. De actividad cero, se pasó en las últimas décadas a una producción de 300 mil toneladas netas de salmón, lo que se reflejó en divisas por 964 millones de dólares en 2001, con un fuerte impacto en el aspecto social de la población que labora en las regiones dedicadas a la salmonicultura (www.salmonchile.cl).

Al conocer los enormes volúmenes de salmones que se transan y por ende, los millones de dólares entrantes para el país, queda claro la preocupación e interés que deben tener los productores nacionales por mantener, y en lo posible mejorar la calidad de su producción. Por ello es necesario realizar constantes monitoreos para controlar, entre otras cosas, posibles enfermedades que se podrían estar gestando y que finalmente pueden acarrear pérdidas parciales o totales de su producción e incluso el cierre de instalaciones por un período de tiempo no despreciable, con el fin de evitar el contagio hacia otros sectores. Es por este motivo que resulta de gran interés poder conocer en cierto detalle la biología de los distintos agentes infecciosos que causan diferentes

enfermedades a nivel local y mundial, con el fin de desarrollar tecnologías para detectarlos oportunamente y eventualmente, encontrar soluciones para su prevención.

En este trabajo, se ha estudiado el patógeno conocido como el virus de la anemia infecciosa del salmón (ISAV), el cual ha sido recientemente detectado en nuestro país (Kibenge y cols., 2001a).

1.2 Características de la enfermedad.

La anemia infecciosa de salmón (ISA), es una enfermedad viral que afecta al salmón Atlántico (*Salmo salar*) en cultivo y produce una infección generalizada con alta mortalidad (entre un 15% a un 100% después de varios meses de la infección) y en consecuencia, grandes pérdidas económicas (Falk y cols., 1998) con los consiguientes daños a la industria acuícola. Dado que este tipo de salmón, *Salmo salar*, presenta una alta prevalencia en Chile, representando cerca de un 60% de la producción nacional, se debe estar alerta a la eventual introducción de este patógeno.

El primer registro que se tiene de la enfermedad corresponde a 1984 en las costas de Noruega (Thorud y cols., 1988), sin embargo no fue hasta 1995 que este virus fue aislado e identificado como el causante de la enfermedad (Dannevig y cols., 1995b).

La distribución geográfica conocida actualmente para el virus corresponde a Noruega (1984) (Thorud y cols., 1988), la costa este de Canadá (New Brunswick, 1996) (Bouchard y cols., 1999), Escocia (Cunningham y cols., 2000) y Reino Unido (1998) (Kibenge, y cols., 2001b). Recientemente se han tenido reportes de brotes en Nova Scotia, Canadá (Ritchie y cols., 2001), en las Islas Faroe, Dinamarca (2000) (Kibenge y cols., 2001b) y Chile (Kibenge y cols., 2001a).

La replicación del virus se ha demostrado experimentalmente en trucha arco iris (*Onchorhynchus mykiss Walbaum*), trucha café (*Salmo trutta*) y trucha de mar anádromo, sin embargo, ninguno de estos salmonídeos han presentado señales de la enfermedad (Danneving & Thorud, 1999).

Inicialmente, los peces infectados con ISAV presentan aletargamiento. En los estadios más avanzados de la enfermedad los peces se van al fondo de la balsa-jaula. La mayoría presenta señales externas notorias como agallas pálidas y hemorragia al interior de la cámara ocular. En algunos casos se ha observado exoftalmia. Los principales cambios fisiopatológicos son ascitis, oscurecimiento y congestión extensa del hígado y bazo y en algunos casos del intestino. El estómago puede ser distendido por un fluido viscoso, generarse hemorragias en su mucosa y ocasionalmente en el músculo esquelético (Danneving & Thorud, 1999).

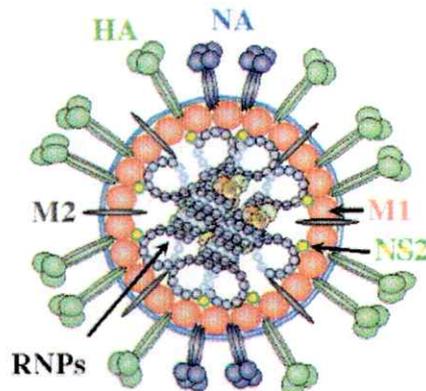
Dentro de los daños histopatológicos, las lesiones del hígado son las más importantes, encontrándose multifocos de hemorragia y posterior necrosis. Estas áreas se distinguen con facilidad ya que presentan eosinofilia y hepatocitos oscuros e hinchados (Danneving & Thorud, 1999).

Los peces moribundos presentan un grave cuadro de anemia y es común encontrar valores de hematocritos bajo el 5% (valor normal alrededor de 35%). Los eritrocitos circulantes muestran notorias anormalidades como tamaño reducido, vacuolización citoplasmática, desintegración nuclear y fragmentación celular. Los peces infectados también desarrollan leucopenia y trombocitopenia. La proporción de eritrocitos inmaduros se eleva y aparecen eritroblastos en circulación (Danneving & Thorud, 1999).

La anemia infecciosa en salmones también puede aparecer en forma crónica con señales difusas difíciles de interpretar. Esta sintomatología menos clara puede acarrear problemas en el diagnóstico y por lo tanto agudizar la propagación viral, con consecuencias desastrosas.

1.3 Características del virus.

El virus de la anemia infecciosa del salmón (ISAV), pertenece a la familia de los orthomyxoviridae. Esta familia se caracteriza por tener un material genético con 8 segmentos de ARN de hebra simple y polaridad negativa y un tamaño total aproximado entre los 12.000 y 15.000 nt. Son virus recubiertos por una membrana lipoproteica con proyecciones (Mjaaland y cols., 1997). En la Figura 1 se muestra la estructura hipotética de esta familia viral, donde se destacan sus componentes estructurales más importantes.



© Paul Digard, Dept Pathology,
University of Cambridge.

Figura 1: Esquema de un orthomyxoviridae.

Esquema de la estructura de un orthomyxoviridae, en el cual las proteínas corresponden a: (HA) hemaglutinina, (NA) neuroaminidasa, (M) proteína de matriz, (RNPs) ribonucleoproteínas, (NS) proteínas no estructurales.

El ISAV, tiene un diámetro aproximado de 100-120 nm, las proyecciones de su envoltura tienen un largo que va entre los 10 y 12 nm (Figura 1) y tiene por blanco primario células endoteliales de varios órganos para su replicación, aunque se sabe que este virus también es capaz de replicar en leucocitos tanto *in vitro* como *in vivo* (Dannevig & Thorud, 1999). Se ha demostrado que el riñón es el principal sitio de replicación del virus (Dannevig y cols., 1995b), lo que contrasta con las infecciones en mamíferos de otros orthomyxovirus que se restringen al sistema respiratorio.

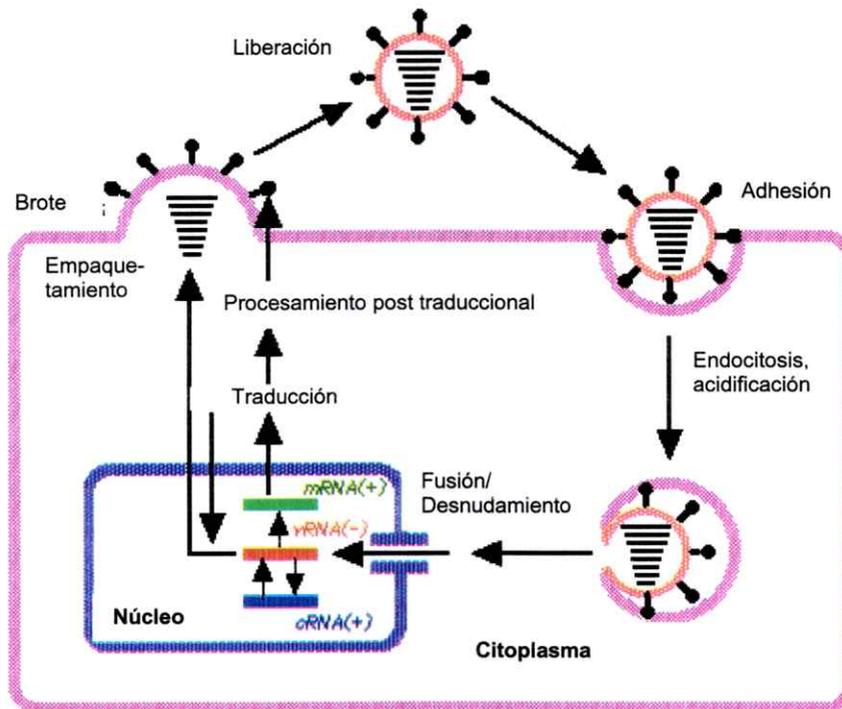


Figura 2: Ciclo replicativo de los orthomyxoviridae.

Esquema de cómo ocurriría la infección viral en los orthomyxovirus, incluyendo su entrada a la célula hospedera, destinación de las RNP al núcleo, replicación, traducción, ensamblaje y liberación (Fuente: <http://www-micro.msb.le.ac.uk/3035/Orthomyxoviruses.html>).

El ISAV comparte con otros miembros de la familia de los orthomyxovirus propiedades que incluyen la actividad hemaglutinante y actividades enzimáticas destructoras de los receptores (Falk y cols., 1998). Respecto a la actividad enzimática destructora de receptores, se detectó una significativa actividad acetilesterasa que hidroliza el sustrato sintético p-nitrofenil acetato. Se observó también, que este virus puede destruir receptores de eritrocitos sin afectar los receptores para el virus de la influenza A o C, lo cual indica claramente que los receptores para ambos orthomyxovirus no son los mismos y más aún, sugiere que la actividad enzimática destructora tiene una especificidad diferente (Falk y cols., 1997).

La liberación del virus desde la célula ocurre por una especie de brote en la membrana celular donde además, se produciría la maduración del virus (Figura 2). Este proceso aparentemente se genera sin destrucción de la célula hospedera, al menos en los estadios iniciales de la infección (Danneving & Thorud, 1999).

El tamaño del genoma viral es aproximadamente 14,5 kb y sus 8 segmentos se distribuyen en el rango de 2,3 a 1,0 kb (Mjaaland y cols., 1997). Comparaciones de los mARN derivados de ISAV muestran que estos tienen extremos terminales 5' heterogéneos y son poliadenilados desde la secuencia señal 13-14 nucleótidos río abajo del 5'-terminal del vARN. Además, se ha demostrado que su replicación se ve inhibida por α -amanitina, clásico inhibidor de la ARN polimerasa II, lo que indica que este virus presenta mecanismos de replicación similares a los otros orthomyxovirus (Snadvik y cols., 2000).

Se sabe que el segmento 8 codifica para dos proteínas no estructurales que no muestran homología significativa con las secuencias del aislado noruego de ISAV y otros orthomyxovirus. El segmento 2 codifica para la polimerasa PB1 de orthomyxoviridae (Blake y cols., 1999). Esta enzima tiene un tamaño de 80,5 KDa, está constituida por 708 aminoácidos, tiene una carga neta de $+22$ a pH neutro y un punto isoeléctrico de 9,9 (Krossoy y cols., 1999). Recientemente, se ha descrito que el segmento 6 codificaría para una hemaglutinina putativa del ISAV. La expresión de esta proteína en líneas celulares de salmón infectadas con el virus genera una actividad con propiedades hemadsortiva de la proteína para eritrocitos de salmón (Rimstad y cols., 2001). También se ha encontrado para el segmento 3, una putativa nucleoproteína, con un ORF de 1.851 nt los cuales codificarían para una proteína que tendría 616 aminoácidos. Esta proteína no tiene homología significativa con otras nucleoproteínas de otros orthomyxovirus, sin embargo se pudo identificar como nucleoproteína por las características de su composición aminoacídica (Snow y cols., 2001).

El análisis de virus purificados por gradiente de sacarosa en SDS-PAGE en condiciones reductoras, muestra 4 polipéptidos principales con tamaños moleculares estimados en 71, 53, 43 y 24 KDa y un polipéptido menor de 15 KDa (Falk y cols., 1997).

La siguiente tabla resume las proteínas codificadas por cada segmento genómico en el ISAV.

Segmento	Largo del segmento (kb)	Proteína codificada	Masa molecular predicha (KDa)
1	2,4	P1	
2	2,4	PB1 (Polimerasa)	80,5
3	2,2	NP (Nucleoproteína)	68,0
4	1,9	P2	65,3
5	1,6	P3	48,8
6	1,5	Hemaglutinina (P4)	43,1
7	1,3	P4/P5	28,6/16,3
8	1,0	P6/P7	26,5/20,3

Tabla 1: Proteínas del virus de la anemia infecciosa del salmón.

Proteínas codificadas por los diferentes segmentos del ISAV y los tamaños esperados para cada una de ellas (Clouthier y cols., 2002).

El virus se propaga en células SHK-1 (“salmon head kidney”) y en CHSE-214 (“chinook salmon embryo”) (Lannan y cols., 1984), donde se observa un marcado efecto citopático entre 12 a 14 días post infección. Recientemente se ha desarrollado una nueva línea celular derivada de leucocitos de salmón, designada como células TO. Infecciones en estas células generan una alta producción del ISAV, presentando al día 9 posterior a la infección un marcado efecto citopático (CPE) y una TCID₅₀ cercana a $10^{9,1}$ ml⁻¹, valor superior a los descritos para SHK-1 ($10^{5,5}$ a $10^{7,8}$) y CHSE-214 ($10^{4,5}$ a $10^{6,5}$) (Wergeland y cols., 2001).

En mayo del 2001 se publicó el aislamiento y caracterización del ISAV desde salmón Coho (*Onchorhynchus mykiss Walbaum*) en Chile, el cual se designó como aislado 7833-1 (Kibenge y cols., 2001a). Este aislado mostró similitudes a los virus aislados en Canadá, como es su capacidad de replicar en células CHSE-214. Además, 7833-1 muestra identidades tan altas como del 99% a nivel nucleotídico y aminoacídicos con los aislados canadienses, como en su perfil proteíco (Kibenge y cols., 2001a). Este brote, el cual produjo alta mortalidad en salmón Coho es único y podría representar la introducción del virus a la población de los peces nativos silvestres o una nueva cepa del virus (Kibenge y cols., 2001a).

Aunque las diferencias y similitudes reportadas entre los distintos aislados virales sugieren la presencia de diferentes cepas entre ambos lados del Atlántico, no se han encontrado diferencias funcionales que confirmen este supuesto (Ritchie y cols., 2001). Basados en análisis del segmento genético 2 se calculó la tasa evolutiva de las diferentes agrupaciones de aislados en $0,96 \times 10^{-3}$ nucleotidos⁻¹ año⁻¹. Sobre esta tasa de mutación se

estimó que estos diferentes aislados divergieron alrededor de 1900, fecha que coincide con el traslado de salmones entre Europa y Norteamérica.

1.4 Métodos de diagnóstico.

El diagnóstico de peces enfermos de ISA está basado en cambios clínicos, incluyendo señales macroscópicas e histopatológicas (Falk y cols., 1995b). El problema de estos es que pueden no ser los indicadores más convenientes para los estados tempranos de la enfermedad (Falk y cols., 1995b), ni para formas crónicas de la misma y por consiguiente, no ser un buen método predictor, ya que un diagnóstico temprano es crucial para evitar la propagación hacia otras balsas-jaulas y o hacia otras zonas. Según este diagnóstico, la presencia de zonas hemorrágicas y necrotizantes en el hígado y valores de hematocritos bajo el 10% son señales claras y confirman la presencia de esta contagiosa enfermedad (Danneving & Thorud, 1999).

El principal problema que se tuvo inicialmente para la detección del virus por los métodos de laboratorio fue encontrar líneas celulares capaces de replicar el virus (Falk & Danneving, 1995). Una vez resuelto este problema, se han producido exitosamente anticuerpos poli y monoclonales contra este virus (Dannevig y cols., 1995a), los cuales han sido usados para la detección de antígenos virales usando inmunofluorescencia indirecta (IFAT, "indirect fluorescent antibody technique"), la cual se ha vislumbrado como una técnica que puede servir como un modo de detección rápido y conveniente para identificar cultivos celulares infectados por ISAV (Falk & Danneving, 1995). Por medio de esta técnica, se puede observar que 24 h post infección aparece una prominente fluorescencia, detectable principalmente en el núcleo, para luego expandirse al

citoplasma y a la membrana celular. Aquí hay que tener en cuenta que una reacción negativa no implica que el virus no esté presente, ya que pueden existir variaciones en las secuencias de las diferentes cepas, las cuales no necesariamente serían reconocidas por los anticuerpos.

Gracias a que actualmente gran parte del genoma de este virus ha sido secuenciado, ha sido posible diseñar partidores para amplificar regiones de algunos segmentos genómicos mediante RT-PCR lo que ha permitido su detección en forma rápida y sensible (Devold y cols., 2000). Al realizar un diagnóstico mediante cultivo celular y determinación de CPE, se pueden obtener resultados negativos para el virus. Sin embargo al analizar las mismas muestras mediante RT-PCR se obtienen los amplicones correspondientes, por lo cual es recomendable confirmar una muestra negativa o sospechosa por esta metodología (Devold y cols., 2000).

1.5 Transmisión de la enfermedad.

Debido a los frecuentes brotes de ISAV que se producen en las pisciculturas y analizando las áreas donde estas se registran, como por ejemplo en las áreas costeras del Atlántico norte, se piensa que deben existir reservorios naturales para este virus. Debido a que presenta una temperatura óptima baja para su desarrollo, se cree que su hospedero natural sería un vertebrado con baja temperatura corporal y probablemente perteneciente a la familia de los salmonídeos (Devold y cols., 2000). Otros han sugerido que el ISAV puede ser transmitido por un par de piojos marinos, *Caligus alongatus* y *Lepeophtheirus salmonis* (Falk y cols., 1997).

Por experimentos de cohabitación se ha demostrado la existencia de transmisión horizontal, indicando que el agua es importante para la diseminación del ISAV. El virus podría transmitirse por varias rutas como la piel, mucus, fecas y orines de peces infectados. Se cree que la principal ruta de entrada es por medio de las agallas o heridas en la piel. Parece ser que el tiempo de sobrevivencia del virus en el mar es corto, sin embargo algunos experimentos de transmisión han demostrado que la infectividad de tejidos permanece por al menos 20 h a 6°C (Danneving & Thorud, 1999).

La diseminación del ISAV entre las distintas pisciculturas ocurre principalmente por compra de *smolts* y peces adultos infectados que luego generan la transmisión horizontal, lo mismo que aguas contaminadas no tratadas. No existe aún evidencia que avale su transmisión vertical (Danneving & Thorud, 1999), existiendo por el contrario reportes que niegan este tipo de transmisión (Melville & Griffiths, 1999).

1.6 Tratamiento y protección.

No existe actualmente ningún tratamiento conocido para el ISAV, por lo cual las políticas preventivas y restricciones gubernamentales sobre el manejo de salmonídeos son la única fuente de protección. Dentro de estas estrategias se cuentan la prohibición de intercambio de salmones vivos y sus ovas entre regiones e incluso entre jaulas.

Debido a la ausencia de tratamientos efectivos y viables para la industria salmonicoltora, el diagnóstico adecuado y temprano de esta enfermedad es crucial en el control de los brotes epidémicos.

OBJETIVOS

Objetivo general.

Estudiar algunos aspectos del ciclo replicativo del ISAV mediante la utilización de anticuerpos monoclonales.

Objetivos específicos.

1. Establecimiento de las condiciones óptimas para el crecimiento del ISAV y estandarizar las condiciones de infección en células CHSE-214.
2. Desarrollo y caracterización de un panel de anticuerpos monoclonales (AcMos) contra ISAV.
3. Determinación y localización de los componentes proteicos del ISAV en células CHSE-214 infectadas con el virus, por medio del uso de anticuerpos monoclonales.
4. Determinación, mediante hibridación *in situ*, de la localización celular de algunos de los fragmentos de ARN del ISAV, en células CHSE-214 infectadas.
5. Utilizar el panel de AcMos para el diagnóstico de peces con síndrome icterico.

2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Cultivo celular.

2.1.1 Expansión de células CHSE-214.

Células CHSE-214 fueron cultivadas hasta confluencia en frascos de 175 cm² Nunc (T₁₇₅) o en porta objetos de 8 pozos en medio MEM suplementado con 5% suero fetal bovino (Gibco), aminoácidos no esenciales 0,1 mM (Gibco), glutamina 2 mM (Sigma), estreptomycin sulfato 100 µg/mL (Sigma) y penicilina G sódica 100 UI/mL (Sigma). Al subcultivar las células, se eliminó el medio, se lavó con 20 mL de GKN (NaCl 0,14 M, KCl 5,37 mM, Na₂HPO₄ 9,94 mM, NaH₂PO₄ 5 mM, glucosa 11,1 mM y rojo fenol 0,03 mM, pH 7,1) y se agregó 1,5 mL de tripsina al 5% (Sigma). Se incubó por 20 min a temperatura ambiente o hasta observar desprendimiento celular. Finalmente se agregó medio MEM completo en un volumen equivalente a 2 ó 3 veces el requerido por botella (50 mL por cada T₁₇₅) y se repartió en 2 ó 3 botellas. Las células así expandidas, se dejaron creciendo a 16°C.

2.1.2 Propagación del ISAV.

Células CHSE-214 en confluencia, fueron infectadas con un aislado canadiense del ISAV proveniente de New Brunswick. Para ello, se eliminó el medio y se reemplazó por medio MEM completo, pero sin suero, para favorecer la infección. La infección se realizó empleando una dilución 1:10 del ISAV que presentaba una TCID₅₀ inferida de 1,0x10⁵ por mL (sección 2.1.3). Cinco horas post infección, las células fueron suplementadas con suero fetal de modo de alcanzar una concentración final de 5%. Este

cultivo celular infectado, se dejó a 16°C por al menos 12 días o hasta alcanzar un efecto citopático (CPE) cercano a un 80%. En estas condiciones se procedió a cosechar el virus.

2.1.3 Cálculo de dosis infectiva en cultivo celular (TCID₅₀) para un lisado de ISAV.

Se conoce como TCID₅₀/mL a la dosis por la cual el 50% de células son infectadas con un inóculo determinado. Esta fue determinada mediante dos aproximaciones distintas.

2.1.3.a Visualización directa del efecto citopático (CPE).

Células CHSE-214 confluentes fueron expandidas en placas de poliestireno para cultivo celular de 96 pozos (Nunc). Las células fueron lavadas con GKN y tripsinizadas (sección 2.1.1) y finalmente suspendidas en 100 mL de medio MEM completo. De esta suspensión, se agregaron 200 µL por pozo.

Un día después de la expansión, las células CHSE-214 fueron infectadas con el virus en dilución seriada en base 10 (sección 2.1.2), el cual provenía de un lisado clarificado de células CHSE-214 (sección 2.1.4). Un mes post infección, las células fueron observadas al microscopio invertido por contraste de fase (Nikon TMS) y se visualizó la presencia o ausencia de efecto citopático en cada pozo. De este modo, se consideró como positivo todo pocillo que mostró al menos un foco de CPE y como negativo aquel con ausencia absoluta de focos de CPE.

Se calculó el CPE porcentual para cada una de las diluciones empleadas y con estos valores se estimó la TCID₅₀, según la siguiente fórmula:

$$TCID_{50} = \frac{(\% > 50\%) - (50\%)}{(\% > 50\%) - (\% < 50\%)}$$

donde (% > 50%) corresponde al porcentaje inmediatamente mayor al 50% y (% < 50%) corresponde al porcentaje inmediatamente menor al 50% con CPE. El valor obtenido corresponde a la fracción de la potencia estimada en base 10, para las diluciones que generan un CPE del 50% (Wergenland & Jakobsen, 2001).

2.1.3.b Mediante inmunofluorescencia indirecta.

Once días post infección se realizó una inmunofluorescencia indirecta para cada pozo de la placa. Los pozos fueron lavados con 200 μ L de PBS y fijados con paraformaldehído 3,7% por 10 min, lavadas con PBS y permeabilizadas con PBS-Triton-X100 0,1% por 10 min. Posteriormente, se incubó 1h con el AcMo anti ISAV 2C2/H4, en una dilución 1:100 en caseína sacarosa al 2% (caseína 2%, sacarosa 2% en PBS) a temperatura ambiente. Después, se lavó con PBS y se incubó con un segundo anticuerpo anti IgG de ratón Fc específico, conjugado con FITC (Sigma) en caseína sacarosa al 2% por 1h a temperatura ambiente en dilución 1:100. Posteriormente, se lavó con PBS y se agregó 30 μ L por pozo de DABCO (2,5% DABCO Sigma, en glicerol 90%). La placa de 96 pozos se observó en forma invertida al microscopio de epifluorescencia (Zeiss Axioskop), con un aumento de 10X. De igual modo a la sección anterior, se calculó el $TCID_{50}$, considerándose positivos aquellos pozos con células fluorescentes y negativos aquellos con ausencia de fluorescencia.

2.1.4 Clarificación del lisado.

Previo a la clarificación, los lisados de células CHSE-214 infectadas con ISAV, que presentaban marcado efecto citopático, fueron sometidas a ciclos de congelamiento

y descongelamiento (-20°C) para permitir una mayor liberación viral desde los restos celulares (Kibenge y cols., 2001a).

Con el propósito de obtener una preparación libre de restos celulares, los lisados de células CHSE-214 infectados con ISAV, fueron clarificados por una centrifugación a 7.300 x g (centrífuga Sorval RC3B plus, rotor: 5845 H) por 30 min a 4°C. El sedimento que contiene aún una alta concentración viral, fue guardado a -80°C, con el propósito de ser utilizado en la propagación viral. El sobrenadante fue utilizado en los ensayos de esta tesis.

2.1.5 Enriquecimiento viral por medio de polietilenglicol 8.000 (PEG).

Al lisado (300 mL) clarificado (sección 2.1.4) se le agregó PEG 8.000 (5% concentración final), NaCl (3,23% concentración final) y azida de sodio (0,1%) y se dejó toda la noche en agitación suave a 4°C (Kibenge y col., 2000). Posteriormente, se centrifugó a 17.000 x g por 90 min a 4°C (Kubota 7930). El sedimento, fue resuspendido en amortiguador TNE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, NaCl 0,1 mM, pH 7,5) y fue centrifugado nuevamente a 17.000 x g por 20 min a 4°C (Kubota 7930). Tanto el precipitado como el sobrenadante fueron conservados a -80°C para su posterior purificación.

2.1.6 Purificación viral mediante gradiente de Ficoll.

Se prepararon dos soluciones de Ficoll 4.000 (Amresco) al 10 y al 25% en amortiguador TNE. Estas soluciones fueron colocadas en un tubo Sorvall para ultracentrifuga de 4 mL donde se agregó 1,5 mL de solución de Ficoll al 25%. Sobre esta, cuidando de no mezclar ambas soluciones, se agregó 1,6 mL de solución de Ficoll

10%. Sobre esta última y cuidadosamente, se agregó 0,5 mL del virus obtenido del paso anterior (sección 2.1.5), ya sea el sobrenadante o el precipitado de la concentración por PEG 8.000 (sección 2.1.5). Se ultracentrifugó en capachos pendulantes por 1h a 95.000 x g y 4°C (Sorval Combi, rotor TST 60.4). Terminada la ultracentrifugación, se retiró la banda generada entre las dos fases del gradiente de Ficoll. Se obtuvo además, un precipitado el cual también fue recuperado. Ambos fueron resuspendidos en amortiguador TNE. El precipitado fue centrifugado a 11.000 x g (Ependorff centrifuge 5415C) por 10 min, vuelto a resuspender en 100 µL del mismo amortiguador y guardado a -80°C. La banda fue ultracentrifugada a 100.000 x g por 45 min a 4°C (Sorval RCM120) y el precipitado se guardó a -80°C.

2.1.7 Concentración por ultracentrifugación.

Alternativamente, el virus fue concentrado por ultracentrifugación a partir de un lisado clarificado (sección 2.1.4). Quinientos mL de este clarificado fueron ultracentrifugados a 100.000 x g por 1h a 4°C (Sorvall ultracentrifuge Combi ODT, rotor Sorvall AH-629). El sedimento, se resuspendió en 4 mL de PBS con azida (0,1%) y se centrifugó a 16.000 x g por 10 min a 4°C (Hettich MiKro 22R, rotor E1547). Este sedimento se resuspendió en 500 µL de PBS y se guardó a -20°C rotulado como ultracentrifugado no soluble. El sobrenadante se volvió a ultracentrifugar a 100.000 x g por 1 h a 4°C (Sorvall RC120, rotor AT-314). Este segundo sedimento se resuspendió en 100 µL de PBS y se guardó también a -20°C.

2.2 Anticuerpos monoclonales.

2.2.1 Obtención de anticuerpos monoclonales.

Los AcMos anti ISAV fueron producidos como se describe a continuación. Ratones Balb/c fueron inyectados vía intraperitoneal con 25 µg de un semipurificado de ISAV por ultracentrifugación (sección 2.1.7) y coadyuvante de Freund completo. Se dio una segunda y tercera inmunización con la misma cantidad viral, pero con coadyuvante incompleto, a los 15 y 30 días respectivamente. Sesenta días posteriores a la inmunización, los ratones recibieron un refuerzo endovenoso. Tres días después, los ratones fueron sacrificados para la obtención de los linfocitos esplénicos. Estos linfocitos fueron fusionados con células NS0/2 (mieloma de ratón Balb/c, deficientes en la enzima hipoxantil-guanilfosforribosil transferasa) según el protocolo de Köhler y Milstein (Köhler & Milstein, 1975) con algunas modificaciones (Jamett y cols., 2001). Estos hibridomas fueron evaluados por un ensayo de ELISA 14 días posteriores a la fusión y aquellos con reactividad positiva fueron expandidos a placas de 24 pocillos.

Para la producción del líquido ascítico, los ratones fueron tratados con 0,5 mL de pristano (2,6,10,14-tetrametil-pentadecano) 15 días antes de que fueran inyectados vía intra peritoneal con los hibridomas reclonados. Cuando la cavidad abdominal se encontraba inflamada, el líquido ascítico fue drenado por punción y centrifugado a 600 x g por 10 min (Dynac II centrifuge, Becton Dickinson) para eliminar los restos celulares. Se almacenó a -20°C.

2.2.2 Purificación de anticuerpos monoclonales.

Para la purificación de AcMos desde líquido ascítico se utilizó una columna de afinidad de Sefarosa activada con proteína G (Pharmacia Biotech). La columna activada con proteína G de 15 mL y mantenida a 4°C, fue lavada con 10 volúmenes de PBS a un flujo de 25 gotas por min. Previo a la carga del líquido ascítico estos fueron centrifugados a 6.000 x g por 5 min (Ependorff centrifuge 5415C). Se cargaron 6 mL del líquido ascítico y se eluyó a un flujo de 5 gotas por min. Posteriormente, se lavó la columna con 15 volúmenes de PBS a un flujo de 20 gotas por min. Los AcMos fueron eluidos con acetato de amonio 0,5 M, pH 2,8 con un flujo de 1 mL/min. Los eluidos, en volúmenes de 1 mL por fracción, fueron recuperados en 1 mL de Tris 1 M, pH 8,5.

Una vez terminada la elución, la columna fue lavada con 2 volúmenes de ácido acético al 20%, para finalmente dejarla en equilibrio con PBS. La columna se guardó a 4°C en PBS con azida de sodio 0,1% hasta su nuevo uso.

Para la cuantificación proteica de las fracciones correspondientes a los AcMos, se determinó la absorbancia a 280 nm (UV-160A UV-visible, Shimadzu). De acuerdo al coeficiente de extinción para proteínas, 1 DO₂₈₀ es equivalente a 1,40 mg/mL. Aquellas fracciones que presentaron lecturas sobre 0,2 DO se juntaron y se dializaron contra PBS o solución de bicarbonato de sodio 0,1 M, NaCl 0,5 M, pH 8,3.

2.2.3 Especificidad de los anticuerpos monoclonales.

Para descartar reactividad cruzada de los AcMos contra otros patógenos presentes en salmones, se realizaron cultivos de diferentes bacterias crecidas a 25°C en 5 mL de medio LB (triptona 0,02 g/mL, extracto de levadura 0,005 g/mL, NaCl 85 mM).

Estas bacterias se emplearon en frotis para ser analizadas por inmunofluorescencia indirecta. Las bacterias utilizadas fueron: *Aeromona caviae*, *Aeromona sobria*, *Aeromona salmonicida*, *Pseudomona fluorescense*, *Vibrio anguillarum*, *Piscisickettsia salmonis*, *Aeromona hidrófila* (aislados del lago Llanquihue, Ranco y Rupanco). Los AcMos también se ensayaron contra el virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV) cultivado en células CHSE-214.

Del cultivo bacteriano se tomaron 200 μL , los cuales se centrifugaron a $2.800 \times g$ por 5 min (Mikro 22R, Hettich zentrifugen). El precipitado así obtenido fue resuspendido en 200 μL de PBS, de los cuales se toman 5 μL para hacer el frotis en un porta objeto. Una vez secado el frotis y fijadas las bacterias se procedió de modo similar a las IFI realizadas con cultivo celular (sección 2.3.5), empleando el panel de los 8 AcMos contra ISAV. Como controles positivos se utilizaron AcMos contra *Piscisickettsia salmonis* y *Pseudomona fluorescense*.

2.3 Caracterización del ISAV.

2.3.1 Electroforesis en geles de poliacrilamida para proteínas.

Se preparó un gel de poliacrilamida al 12,5% (acrilamida-bisacrilamida, 30:0,8), en condiciones denaturantes con 0,1% SDS. Se cargaron de 5 a 20 μg de proteína de una preparación viral concentrada por ultracentrifugación (sección 2.1.7). La muestra fue calentada por 3 min en presencia de β -mercaptoetanol y SDS. También, se analizaron muestras en condiciones no reductoras las que no fueron calentadas. En forma paralela se cargaron 8 μL de estándar de proteínas (BenchmarkTM prestained protein ladder,

Invitrogen). El gel fue sometido a un voltaje de 60 V hasta que el azul de bromofenol alcanzara el gel concentrador y luego a 100 V por 1 h 30 min.

Para la visualización de las bandas proteicas se realizaron dos tipos de tinciones. La tinción con azul de Coomassie permite visualizar las bandas proteicas de las muestras analizadas por electroforesis con un límite de sensibilidad mayor a 0,5 µg de proteína. Los geles se tñieron con una solución de azul de Coomassie R-250 al 0,25% (p/v), metanol 45% y ácido acético glacial al 10%. Luego se destiñó con una solución que contenía metanol al 45% y ácido acético glacial al 10%. Finalmente, el gel fue secado al vacío (equipo Slab Gel Dryer modelo SGD 4050, Savant, N.Y., USA) y digitalizado (scanner Epson perfection 1200S, programa: Presto Pege Maneger for Epson).

Alternativamente el gel se tñió con nitrato de plata utilizando un kit de tinción de plata para proteínas (Winkler Ltda.), el cual se basa en el protocolo descrito por Wray y sus colaboradores (Wray y cols., 1981), cuya sensibilidad es de 2-5 ng de proteína por banda. El procedimiento consta de 5 pasos: fijación, lavado, tinción, revelado y detención, los cuales se realizaron según el instructivo del fabricante. Finalmente, el gel se sumergió en agua bidestilada por 5 min, se secó al vacío (equipo Slab Gel Dryer modelo SGD 4050, Savant, N.Y., USA) y se digitalizó (scanner Epson perfection 1200S, programa: Presto Pege Maneger for Epson).

2.3.2 Western Blot.

La muestra viral concentrada por ultracentrifugación (sección 2.1.7), fue sometida a una electroforesis según se describe en el punto 2.3.1. El gel se dejó en amortiguador de transferencia (glicina 0,038 M, Tris-HCl 0,048 M pH 8,8, SDS 0,013 M

y metanol 20%) por 15 min a temperatura ambiente. Las proteínas fueron electrotransferidas a una membrana de nitrocelulosa en una cámara de electrotransferencia (modelo Mini Transblot electrophoretic transfer cell, BIO-RAD) por 1 h a 100 V. Terminada la transferencia, la membrana se dejó bloqueando toda la noche en caseína sacarosa al 4% en agitación y temperatura ambiente. La membrana se cortó en tiras de alrededor de 0,5 cm cada una, las que se incubaron por 2 h a temperatura ambiente con el AcMo específico anti ISAV en diluciones de 1:100 y 1:200 en caseína sacarosa al 4%. Se lavó 5 veces con PBS-Tween 20 0,1% y se incubó con un anticuerpo anti IgG de ratón Fc específico, conjugado con fosfatasa alcalina (Pierce) en una dilución 1:100, en caseína sacarosa al 4% por 1 h en agitación a temperatura ambiente. El revelado se realizó con NBT/BCIP en amortiguador FAL (100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂) en oscuridad hasta observar aparición de las bandas.

2.3.3 Amplificación del genoma viral mediante RT-PCR.

Como técnica confirmatoria, se realizó un RT-PCR para la detección de ISAV tanto en el sobrenadante del cultivo como en las células crecidas en las placas de 96 pozos.

2.3.3.a Aislamiento del ARN.

El ARN se extrajo usando el kit comercial de Trizol-Is (Invitrogen), según las instrucciones del fabricante, salvo que se dejó precipitando toda la noche a -20°C.

2.3.3.b Síntesis de cADN.

Una vez aislado el ARN, se sintetizó el cADN como sigue: 7,1 µL de solución de hexámeros al azar (52,82 ng/µL) fueron mezclados con 5 µL de ARN de la muestra. La

mezcla se incubó a 95°C por 5 min, luego se incubó en hielo y se centrifugó a alta velocidad. Finalmente a la muestra de ARN denaturada se le agregó 7,9 µL de una mezcla de RT, la cual contiene 7,0 µL de tampón de síntesis de cADN (5X first strand buffer Gibco, 0,1 M DTT, 4 mM dNTPs), 0,2 µL inhibidor de nucleasas (40 u/µL Rnase out, Invitrogen) y 0,7 µL RT M-MLV (200 u/µL, Invitrogen) y la síntesis de cADN se llevó a cabo por 10 min a 25°C y luego a 50 min a 37°C en un termociclador (PTC-100).

2.3.3.c Reacción en cadena de la polimerasa.

Para la PCR, en un volumen final de 50 µL, se agregó: 1,5 µL MgCl₂, 50 mM, 2,0 µL de cada uno de los partidores (F: 5' AAG GGA AAA CAA AGA GAT A 3', R: 5' TCT TCT TTG CTT AGC TGT TT 3') a una concentración de 25 pmol/µL, 5,0 µL tampón PCR 10 X (GibcoBRL), 5 µL dNTPs 1,5 mM, 29 µL agua milli Q, 0,5 µL Taq DNA polimerasa (GibcoBRL) 5 u/µL y 5 µL de cADN. La muestra se denaturó por 5 min a 95°C y se amplificó en 35 ciclos de: 95°C por 1 min, 50°C por 1 min, 72°C por un min, con una extensión final de 10 min a 72°C.

2.3.3.d Visualización del producto de amplificación.

Los amplificados fueron separados por medio de electroforesis en geles de agarosa al 1,5% en amortiguador TAE (Tris base 40 mM, ácido acético 0,115%, EDTA 5 mM) con 0,4 µg/mL de bromuro de etidio. Se cargaron 8 µL de la mezcla de PCR con 0,8 µL de solución de carga (1mM EDTA pH 8,0, 0,25% azul de bromofenol, 0,25% xilencianol y 50% glicerol). La electroforesis se llevó a cabo a 60 V por 40 min y se observó en un transiluminador UV a 253 nm. El gel fue fotografiado con una cámara

digital (DC120 digital y el programa computacional: PictureWork's PhotoEnhancer Kodak).

2.3.4 Visualización de los segmentos genómicos del ISAV.

2.3.4.a Gel de poliacrilamida para ácidos nucleicos.

Para la resolución de los segmentos virales se utilizó un gel denaturante de poliacrilamida con urea 7 M y en una cámara SA-32 (Gibco, Lifecodes). Para esto, los vidrios fueron preparados del siguiente modo: lavados con detergente y agua milli Q y luego se lavaron dos veces con una mezcla de etanol/agua 1:1. Posteriormente, fueron lavados dos veces con una mezcla metanol/acetona 1:1. El vidrio alto se trató con 1 mL de sigmacoat (Sigma), se dejó secar durante 5 min y luego se quitó el exceso con un pañuelo desechable húmedo con agua milli Q. El vidrio bajo se trató con 1 mL de una mezcla que contenía 994 μ L de etanol 100%, 5 μ L de ácido acético glacial, 1 μ L de γ -metacriloxipropiltrimetoxisilano (Sigma). La mezcla se aplicó con un pañuelo desechable, se dejó secar durante 5 min y se lavó 2 veces con etanol absoluto. Se armaron los vidrios usando los espaciadores de 0,4 mm y las prensas de la cámara.

Se preparó el gel de poliacrilamida al 4% agregando 20 mL de agua milli Q, 15,75 gr de urea, 1,875 mL de TBE 10X (concentración final: 0,045 M tris-borato, 0,001 M EDTA), 3,8 mL de acrilamida-bisacrilamida al 40% (38:1) y 250 μ L de persulfato de amonio al 10%. Posteriormente, se filtró la mezcla en un filtro Millipore 0,22 μ m y después de agregar 12 μ L de TEMED (Sigma), se aplicó entre los vidrios y se dejó polimerizar por al menos 45 min. El gel se ajustó a la cámara y se sometió a una electroforesis por 30 min en TBE 0,5 X y a 2.000 V. Las muestras se prepararon mezclando 3 μ L de tampón de carga (formamida 100% y bromofenol 0,05 %) con 3 μ L

de muestra (3,72 μ g de vARN). La mezcla se incubó a 95°C por 3 min y se cargaron 6 μ L. Las muestras fueron sometidas a electroforesis por 1 h y 30 min a 2.000 V (Quick-type™ user's manual).

2.3.4.b Tinción con plata para ácidos nucleicos.

Para la detección de los segmentos virales se utilizó el kit de tinción con plata para ácidos nucleicos (Winkler). Una vez finalizada la electroforesis, se separaron los vidrios y el gel quedó adherido al vidrio bajo, el que se tiñó con plata de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El gel unido al vidrio, fue fijado, teñido y revelado con una cantidad de solución suficiente para cubrirlo. Posteriormente el gel se transfirió a un papel filtro y fue secado en un secador de geles al vacío por 40 min a 80°C (equipo Slab Gel Dryer modelo SGD 4050, Savant, NY, USA) y digitalizado (scanner Epson perfection 1200S, programa: Presto Pege Maneger for Epson).

2.3.5 Inmunofluorescencias Indirectas.

Células CHSE-214, con o sin infectar, fueron fijadas con paraformaldehído fresco al 3,7% por 10 min. Luego, se lavó con PBS y se permeabilizó con Triton X100 al 0,1% en PBS por 10 min. Se lavó nuevamente con PBS y luego se incubó por 1 h con una dilución 1:100 de líquido ascítico (AcMo anti ISAV) en caseína-sacarosa al 2%. Se lavó con PBS y se incubó con un anti IgG de ratón Fc específico conjugado con fluoresceína isotiocianato (FITC) en dilución 1:100 en caseína sacarosa al 2% por 30 min en oscuridad. Todas las incubaciones se realizaron en cámara húmeda y a temperatura ambiente. Finalmente se lavó con PBS y se montó con solución de montaje que contiene DABCO (2,5% de DABCO en glicerol al 90%). Finalmente, la muestra fue

observada al microscopio de epifluorescencia (Microscopio Zeiss Axioskop) y fotografiada con cámara digital (DC120 digital, programa computacional: PictureWorks' PhotoEnhancer).

2.4 Hibridación *in situ* (HIS).

2.4.1 Diseño de sondas para HIS.

Con las distintas secuencias del virus de la anemia infecciosa del salmón disponibles en la red, se realizaron alineamientos múltiples para cada uno de los diferentes segmentos virales (www.expasy.ch). Para el segmento 1 existe sólo una secuencia, la cual al momento de realizar el alineamiento estaba incompleta.

Para el diseño de las sondas para las HIS, se eligieron dos segmentos virales, correspondientes a los segmentos 2 (2,4 Kb) y 6 (1,5 Kb), que codifican para una putativa polimerasa PB1 y para la hemaglutinina (HA), respectivamente. Con los alineamientos realizados para estos segmentos, se buscaron zonas conservadas y no demasiado ricas en GC. Las secuencias de estas sondas son:

Segmento 2

Sentido: ISAV2-S: 5' TCA AGA AGC TTC AGA CTA CT 3'

Antisentido: ISAV2-AS: 3' AGT TCT TCG AAG TCT GAT GA 5'

Segmento 6

Sentido: ISAV6-S: 5' TAA ACT TGT GAA AGA ATT TGA CC 3'

Antisentido: ISAV6-AS: 3' ATT TGA ACA CTT TCT TAA ACT GG 5'

Como control, se utilizaron partidores para el 18S rARN de salmonídeos disponibles en BiosChile I.G.S.A. y cuyas secuencias son:

Sentido: 18S-S: 5' GAT GCG TGC ATT TAT CAG A 3'

Antisentido: 18S-AS: 3' ATT AAC CTT ACT CAG GTG 5'

Las sondas se diluyeron en amortiguador TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 8) a una concentración de 50 pmol/ μ L.

2.4.2 Marcaje de sonda con digoxigenina.

Para el marcaje de la sonda con digoxigenina (DIG), se utilizó transferasa terminal de deoxinucleótidos, TdT. En un tubo en hielo se agregó 2 μ L tampón 5 X Promega (500 mM amortiguador cacodilato pH 6,8, 5 mM CoCl₂ y 0,5 mM DTT), 1 μ L de dATP 9 mM, 4 μ L de agua libre de nucleasas, 1 μ L de oligonucleótido (50 pmol) previamente calentado por 10 min a 80°C, 1 μ L 1 mM DIG-dUTP (Roche) y 1 μ L TdT (Promega 25 unidades). La mezcla se incubó 15 min a 37°C y la reacción fue detenida colocándola en hielo y agregando 1 μ L de la mezcla glicógeno-EDTA (200 μ L contienen: 0,2 M EDTA pH 8 con 1 μ L de solución de glicógeno 20 mg/mL).

El marcaje de la sonda fue evaluado por dot blot en membrana de nitrocelulosa, donde se agregó 1 μ L de la sonda marcada, se dejó secar y se bloqueó con caseína sacarosa al 4% durante toda la noche. Se reveló con un anticuerpo policlonal anti-DIG desarrollado en conejo conjugado con fosfatasa alcalina a una dilución 1:300 (Dako). Como sustrato se usó NBT/BCIP en amortiguador FAL (100 mM tris-HCl, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂) (Villegas y cols., 2002).

2.4.3 Tratamiento de cámara de cultivo con Pegotina.

Debido al tratamiento que reciben las células en la HIS y a la pérdida de adherencia que sufren las células infectadas, se decidió tratar los porta objetos de 8 pozos (Nunc) con Pegotina para minimizar la pérdida de células (Burzio y cols., 1997).

Un mg de Pegotina liofilizada (BiosChile I.G.S.A), fue disuelta en 1 mL de ácido acético 3% y filtrada por 0,22 μm . Esta solución se diluyó a 50 $\mu\text{g/mL}$ con ácido acético estéril al 0,1%. Los porta objetos se trataron con 200 μL por pozo por 30 min a temperatura ambiente bajo campana. Luego se eliminó la solución del adhesivo y se lavó con PBS estéril. En estas cámaras se cultivaron células CHSE-214 las que luego fueron infectadas con ISAV de acuerdo a la sección 2.1.2.

2.4.4 Hibridación *in situ*.

Células CHSE-214 con o sin infectar, fueron lavadas con PBS y luego tratadas con HCl 0,2 N por 10 min a temperatura ambiente. A continuación, las células CHSE-214 se pre-hibridaron por 30 min a 37°C para las sondas anti ISAV y a 30°C para las sondas anti 18S rARN, en solución de hibridación (formamida 50%, 4 X SSC¹, 1X Denhardt, 10% dextran sulfato, 150 $\mu\text{g/mL}$ de tARN, 150 $\mu\text{g/mL}$ de ADN de espermio de arenque, 2 mM EDTA) (Sambrook y cols., 1989). Luego, se dejó hibridando toda la noche agregando la sonda marcada con DIG a una concentración de 5 pmol/ μL e incubando a 37°C para sondas anti ISAV y a 30°C para las sondas anti 18S rARN.

A la mañana siguiente, se hicieron lavados secuenciales con 2 X SSC por 10 min a temperatura ambiente, 1 X SSC por 10 min a temperatura ambiente y luego con 0,5 X

¹ SSC 20X: 3M NaCl, 300mM citrato de sodio, pH 7.0

SSC por 30 min a 42°C para sondas dirigidas contra ISAV y a 30°C para sondas anti 18S rARN. Finalmente, un lavado con 0,5 X SSC por 5 min a temperatura ambiente, todo en agitación suave. Luego, se bloqueó con caseína sacarosa 2%, a temperatura ambiente y a los 30 min, y después de eliminar la solución de bloqueo, se agregó el anticuerpo anti DIG, conjugado con fosfatasa alcalina en la misma solución de bloqueo en una dilución 1:300. Después de incubar por 2 h a temperatura ambiente se lavó con PBS y se reveló con NBT/BCIP en amortiguador FAL (100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂), por 12 h en una cámara húmeda y en oscuridad. La reacción fue detenida con PBS y montada en medio acuoso (Dako) (Villegas y col., 2002). Finalmente, la muestra se observó al microscopio (Zeiss, Axioskop) y fue fotografiada (Zeiss, MC 80).

2.4.5 Tinción de nucleolos.

A modo de control y para tener una visualización de los nucleolos en células CHSE-214, se realizaron tinciones con Giemsa (Merck) y azul de toluidina (Merck), los cuales tiñen preferentemente el ARN ribosomal y de este modo los nucleolos. Para ambas tinciones las células fueron fijadas con paraformaldehído al 3,7%. Luego fueron teñidas con azul de toluidina al 0,05% en amortiguador McIlvaine (0,1 M ácido cítrico y 0,2 M Na₂HPO₄) por 5 min a temperatura ambiente o por 3 min con Giemsa. Posteriormente, se lavó con PBS y fue observado al microscopio en fase clara (Microscopio Zeiss Axioskop).

3 RESULTADOS

3.1 Anticuerpos monoclonales.

3.1.1 Obtención de anticuerpos monoclonales.

Uno de los objetivos de esta tesis fue producir un panel de anticuerpos monoclonales contra el ISAV que fueron utilizados como herramienta para la caracterización del virus. Para ello se cultivó un aislado canadiense del ISAV en células CHSE-214 (sección 2.1.2) y se purificó parcialmente por ultracentrifugación (sección 2.1.7). Esta muestra ultracentrifugada se utilizó para inmunizar ratones Balb/c como se describió anteriormente (Jamett y cols., 2001). La fusión de las células esplénicas con la líneas de mieloma NS0/2, la selección de los clones, la reclonación, el cultivo de los hibridomas y la producción de líquido ascítico se realizó de acuerdo a los protocolos estándares del laboratorio (Jamett y cols., 2001).

Después de eliminar aquellos anticuerpos que reaccionaban con células CHSE-214 descartándose aquellos clones que presentaron reacción cruzada o algún grado de inespecificidad en ensayos de ELISA, se hizo una selección donde se obtuvieron 8 AcMos, los que se denominaron 2C2/C7, 2C2/H4, 3E8/B3, 3G8/B10, 4A10/C9, 4G1/H6, 8D7/F6 y 8F7/H10.

3.2 Propagación del ISAV.

Para obtener una cantidad adecuada de virus para la generación de un panel de AcMos, se cultivó exitosamente un aislado del ISAV proveniente de New Brunswick, Canadá, en células CHSE-214. La infección se realizó con una dilución 1:10 de un lisado clarificado obtenido con anterioridad en el laboratorio y cuya TCID₅₀ inferida fue de 1×10^5 /mL. Alrededor de una semana post infección, se observó efecto citopático (CPE), pero sólo a partir de las 2 semanas post infección se obtuvo un efecto citopático generalizado. Como se muestra en la Figura 3, a los 17 días post infección se observó un CPE mayor al 80%, al compararlo con células CHSE-214 confluentes no infectadas.

Para evaluar la concentración viral en los lisados clarificados se determinó la TCID₅₀. Con este objeto se cultivaron células CHSE-214 en microplacas de cultivo de 96 pocillos. Una vez que las células alcanzaron confluencia, éstas fueron infectadas con diluciones del lisado clarificado que fluctuaron entre 10^{-2} a 10^{-9} y en duplicado. A los 30 días post infección se determinó el CPE en cada pocillo utilizando un microscopio invertido y con contraste de fase. El valor de TCID₅₀/mL se calculó en base a las diluciones que bordean el 50% del CPE y el detalle se muestra en la Figura 4.

En un cultivo representativo y en base a los resultados de la tabla 2 y como se detalla en la Figura 4, se determinó que el lisado tenía una TCID₅₀/mL de $10^{4,3}$ o $2,2 \times 10^4$.

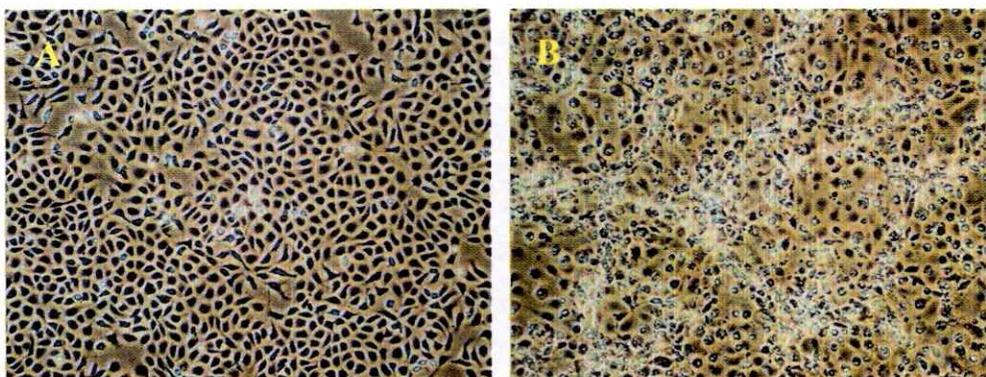


Figura 3: Cultivo de ISAV en células CHSE-214.

(A) Células CHSE-214 crecidas en medio MEM completo y sin infectar. (B) Células CHSE-214 infectadas con el aislado canadiense del ISAV con evidente efecto citopático (CPE) a los 17 días post infección. Este CPE es caracterizado por cambios morfológicos donde las células se desprenden del cultivo celular y se vuelven esféricas.

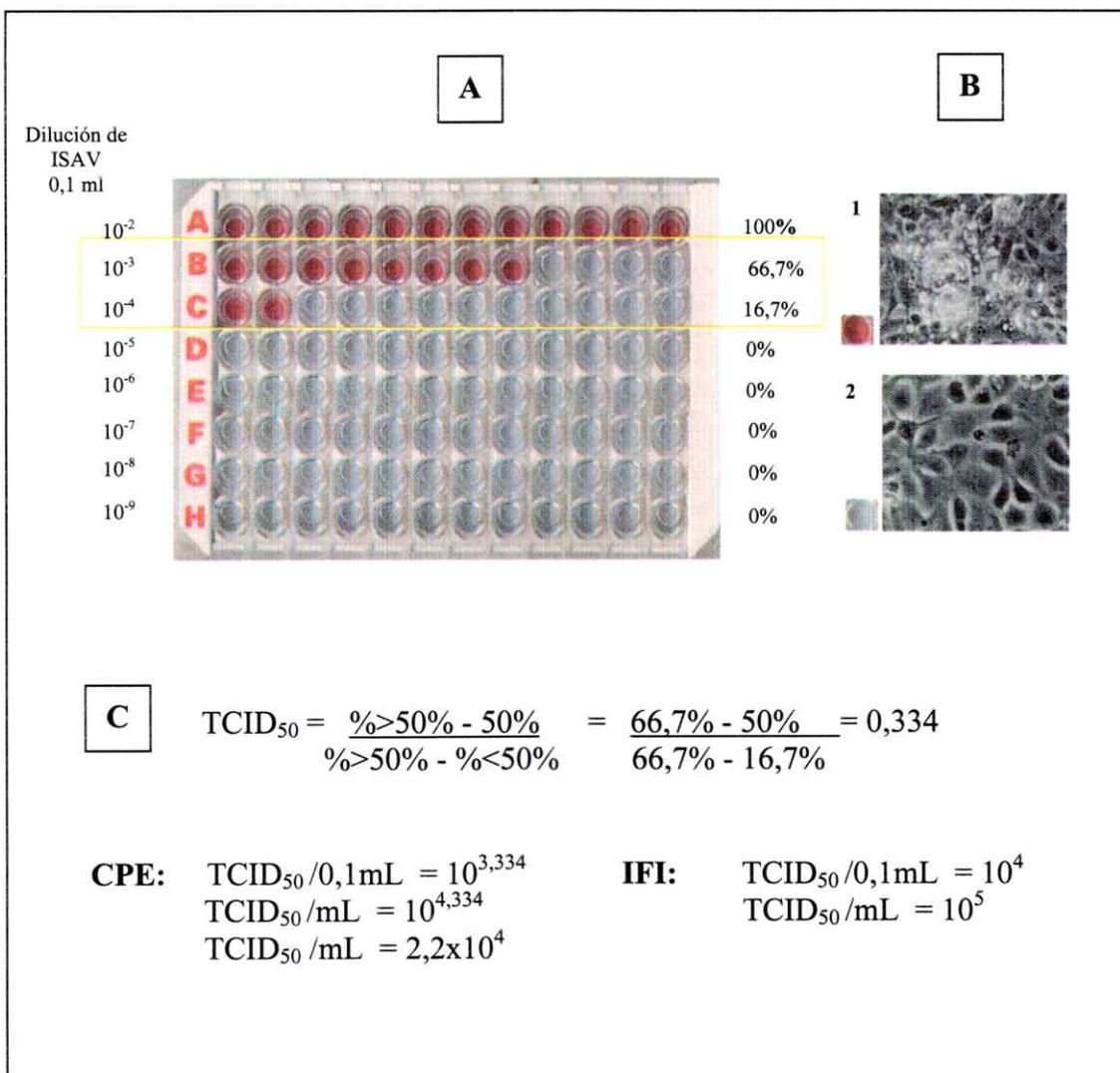


Figura 4: Determinación del TCID₅₀.

Células CHSE-214 fueron cultivadas en microplacas y una vez alcanzada una confluencia de alrededor de 90%, fueron infectadas en dilución seriada en base 10 con un lisado clarificado del aislado canadiense del ISAV, como se indica en (A). A los 30 días post infección se determinó el CPE en cada pocillo y se resolvió como positivo aquel pocillo donde la monocapa celular mostraba alteraciones como las que se observan en (1B) y considerado negativo aquel pocillo sin focos de CPE. Las células controles se muestran en (2B). En (C) se muestra como fue calculado el TCID₅₀ y la explicación se entrega en el texto (sección 2.1.3).

Dilución	Pozos (-) CPE	Pozos (+) CPE	% con CPE
10^{-2}	0	12	100
10^{-3}	4	8	66,7
10^{-4}	10	2	16,7
10^{-5}	12	0	0
10^{-6}	12	0	0
10^{-7}	12	0	0
10^{-8}	12	0	0
10^{-9}	12	0	0

Tabla 2: Determinación de la TCID₅₀ en base al efecto citopático.

Células CHSE-214 cultivadas a confluencia en una placa de cultivo de 96 pocillos, fueron infectadas con las diluciones indicadas con un clarificado de ISAV. A los 30 días post infección se midió el CPE en un microscopio invertido de contraste de fase. Los pozos negativos (0) para CPE se deben a que, producto de la dilución ya no existen partículas virales infectivas y por lo tanto, no se observa CPE.

Dilución	Pozos (-) IFI	Pozos (+) IFI	% con IFI
10^{-2}	0	12	100
10^{-3}	3	9	75
10^{-4}	6	6	50
10^{-5}	11	1	8,3
10^{-6}	12	0	0
10^{-7}	12	0	0
10^{-8}	12	0	0
10^{-9}	12	0	0

Tabla 3: Determinación de la TCID₅₀ por inmunofluorescencia.

Células CHSE-214 cultivadas a confluencia en placas de microtitulación de 96 pocillos fueron infectadas con ISAV en las diluciones indicadas. A los 11 días post infección se detectó la presencia del virus mediante inmunofluorescencia indirecta. Los pozos negativos para ISAV por inmunofluorescencia son producto de ausencia del virus.

Para confirmar el valor inferido de TCID₅₀ se realizó un ensayo en paralelo y en las mismas condiciones anteriores, pero en lugar de medir el CPE, se determinó la presencia de componentes virales mediante inmunofluorescencia. Para ello, a los 11 días post infección, se realizó una inmunofluorescencia como se describe en la sección 2.3.5. La microplaca fue observada invertida en un microscopio de epifluorescencia. Con los resultados de la tabla 3 y como se detalla en la Figura 4, se calculó que el TCID₅₀ era de 10⁵/mL.

3.3 Amplificación del ARN viral por RT-PCR.

Otro método alternativo para confirmar el TCID₅₀ de un lisado viral fue mediante amplificación del segmento 2 del genoma viral por RT-PCR. Con este objetivo, la misma placa empleada para el cálculo de TCID₅₀ mediante CPE, fue analizada mediante amplificación de un fragmento de 451 pb correspondiente al segmento 2 del genoma viral. El fragmento amplificado fue generado a partir tanto del sobrenadante del cultivo, como de las células que permanecen en los pocillos de la placa. Tanto en la fracción celular como en el sobrenadante se amplificó el fragmento de 451 pb para las diluciones virales de 10⁻² y 10⁻³, observándose una mayor intensidad de los amplificadores provenientes del análisis de la fracción celular (Figura 5). En algunos experimentos se obtuvo la banda correspondiente a 451 pb con diluciones de 10⁻⁴ y 10⁻⁵ pero estos fueron variables en intensidad o no se detectaron (Figura 5, carril K). La variación alcanzada con esta técnica tan sensible, puede deberse a irreproducibilidad en la extracción de ARN viral en muestras tan pequeñas.

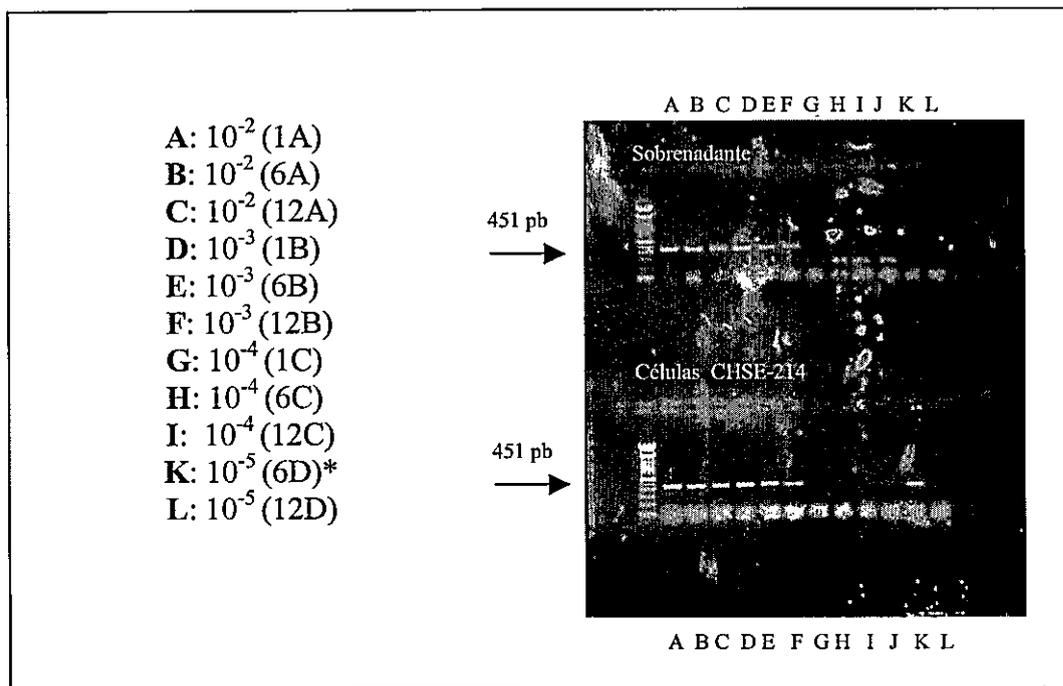


Figura 5: Análisis de TCID₅₀ mediante amplificación del ARN viral por RT-PCR.

Se preparó el ARN total tanto del medio de cultivo como de la monocapa de células adheridas al pocillo, en un experimento en paralelo al mostrado en la Figura 4. Este ARN se utilizó para la amplificación de un fragmento de 451 pb perteneciente al segmento 2 del virus. Las diluciones del virus se muestran en el listado de la izquierda y el análisis de los amplicones mediante electroforesis en el gel de agarosa de la derecha.

3.4 Concentración y purificación del virus de la anemia infecciosa del salmón.

Con el objetivo de tener una preparación viral suficientemente pura para caracterizar las proteínas y los segmentos genómicos del ISAV, se ensayaron una serie de protocolos los cuales se describen a continuación.

3.4.1 Concentración por PEG 8.000.

Un método utilizado con éxito para concentrar y purificar virus es mediante precipitación con polietilenglicol (Kibenge y cols., 2000). Con este objetivo se precipitó el ISAV proveniente de un lisado clarificado, en una solución al 5% de PEG 8.000. El precipitado colectado por centrifugación se disolvió en un tampón TNE (Tris HCl 10 mM, NaCl 100 mM y EDTA 1mM) y se evaluó por SDS/PAGE al 12,5%. Como se muestra en la Figura 6, se observaron bandas discretas cuyos tamaños son 80,5 KDa, 68 KDa, 65,9 KDa, 62,3 KDa, 48 KDa, 43 KDa y 25 KDa. La banda de 80,5 KDa, está presente también en el medio de cultivo de células CHSE-214 que no fueron infectadas con el virus y por lo tanto no correspondería a un componente viral (datos no mostrado), aunque también existe la posibilidad de una superposición de bandas. Las otras bandas están particularmente enriquecidas en la fracción precipitada con PEG 8.000, lo que sugiere que corresponden a proteínas virales.

3.4.2. Purificación en gradiente de Ficoll.

Las gradientes de Ficoll también han sido usadas para la purificación de virus (Kibenge y cols., 2000). Al sedimentar un clarificado de ISAV en un gradiente de Ficoll (25% a 10%) se obtuvo una banda y un sedimento. La concentración de proteínas en la

banda fue de 9 mg/mL en un volumen final de 50 μ L, mientras que el sedimento tenía una concentración de 30 mg/mL en un volumen final de 250 μ L. Estas muestras fueron analizadas en geles de poliacrilamida al 12,5% con SDS como se muestra en la Figura 7, donde se observa una banda mayoritaria de 80,5 KDa, la cual también está presente en el virus precipitado con PEG 8.000 (Figura 6). Tanto el sedimento como la banda de Ficoll, presentan 13 bandas discretas que van desde los 105 a 20 KDa, las cuales difieren de la preparación de células CHSE-214 sin infectar. En general, no se encontró grandes diferencias en los patrones de bandeo entre la banda y el sedimento de la gradiente de Ficoll.

3.4.3 Concentración por ultracentrifugación.

Alternativamente el virus se concentró mediante ultracentrifugación (sección 2.1.7). Como se describió anteriormente, el sedimento obtenido por ultracentrifugación fue analizado por geles de poliacrilamida al 12,5% con SDS, además de Western blot revelado con un suero policlonal anti ISAV desarrollado en ratón (Figura 8). El patrón general de bandas no cambió mayormente cuando se realizó el análisis electroforético en condiciones reductoras o no reductoras, aunque sí se observó una disminución de la intensidad de una banda de alrededor 25 KDa observada en el gel de poliacrilamida teñido con Coomassie (Figura 8), y una leve diferencia en los tamaños de las proteínas reconocidas por los AcMos 4G1/H6 y 8D7/F6 por Western blot (datos no mostrados). Una explicación plausible se puede encontrar en que algunas proteínas, como la HA, forman enlaces disulfuros, que en condiciones reductoras son eliminados generando

peptidos de menor tamaño. El suero policlonal anti ISAV revela 10 bandas cuyos tamaños son de 105, 83, 69, 42, 40, 36, 31, 28 y 20 KDa.

3.4.3.a Caracterización de los AcMos anti ISAV por Western blot.

Como se describió en la sección anterior, al realizar un Western blot con las proteínas virales y el suero policlonal de ratón anti ISAV, se detectaron varias proteínas cuyos tamaños fluctuaron entre los 105 y 20 KDa (Figura 8). Si bien es cierto que este enfoque nos entregaba información preliminar de algunas proteínas del ISAV, al comparar el tamaño de las bandas con los datos de la literatura (Clouthier y cols., 2002), se encontraron algunas inconsistencias, lo cual podría deberse a que el suero policlonal de ratón se produjo con un aislado parcialmente purificado del virus. Por lo tanto, algunos anticuerpos podrían estar reconociendo proteínas de las células CHSE-214, por lo que era necesario producir AcMos específicos para algunas proteínas virales.

Para obtener una mejor caracterización de algunas proteínas virales y para determinar con cual de ellas reaccionaban los diferentes anticuerpos monoclonales del panel descrito anteriormente, se realizaron Western blot. Cabe recordar que estos AcMos fueron seleccionados por su capacidad para reconocer el ISAV y su falta de reacción con células CHSE-214. De este modo, cualquier banda proteica reconocida por un AcMo debiera corresponder a una proteína viral, aunque cabe a posibilidad que producto de la infección viral se sinteticen algunas proteínas celulares antes no identificadas.

Como se muestra en la Figura 9, los AcMos 2C2/C7, 2C2/H4, 3E8/B3, 3G8/B10 son capaces de reconocer una proteína de alrededor de 80,5 KDa. También se observan unas bandas de menor tamaño que podrían corresponder a productos de degradación. Los AcMos 4G1/H6, 8D7/F6 y 8F7/H10 reaccionan con una proteína de 25 KDa. Estas

proteínas también fueron reconocidas por el suero policlonal de ratón (Figura 9). Los controles negativos no mostraron ninguna banda de proteína inmunoreactiva.

3.5 Análisis de los segmentos genómicos del ISAV.

Los orthomyxovirus son virus que se caracterizan por poseer un genoma fragmentado compuesto por 8 segmentos de ARN de polaridad negativa. Por lo tanto, una etapa importante fue determinar en forma preliminar los segmentos genómicos del ISAV sin recurrir a técnicas radioisotópicas. Para ello el ARN total del virus purificado por Trizol-Is, se analizó por electroforesis en geles de poliacrilamida (4%), 7 M urea y teñidos con plata (sección 2.3.4). Como se muestra en la Figura 10, se pueden apreciar 7 fragmentos con tamaños que fluctúan entre los 2.300 a 1.000 nt, tamaños que concuerdan con los descritos para el ISAV (Mjaaland y cols., 1997).

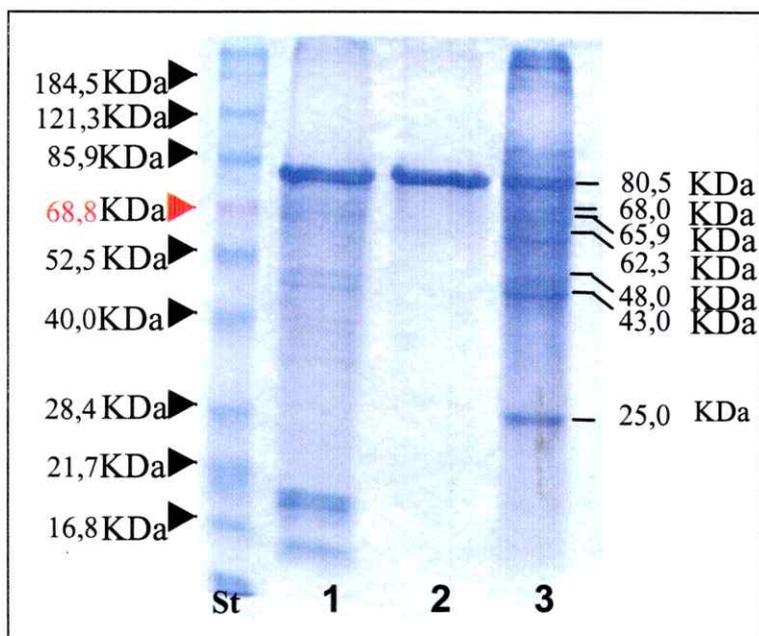


Figura 6: Proteínas virales en distintas etapas de la concentración con PEG.

Alicuotas de cada fracción se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 12,5%, 0,1% SDS. Posterior a la electroforesis las proteínas fueron teñidas con azul de Coomassie. **(1)** Lisado de células CHSE-214 infectadas con ISAV y clarificadas a 7.300 x g (10 µg). **(2)** Fracción soluble después de la precipitación con PEG 8.000 (9 µg). La banda observada podría corresponder a alguna proteína inducida por efecto de la infección. **(3)** Fracción de ISAV precipitada con PEG 8.000 (14 µg). A la derecha se indica el tamaño de las proteínas enriquecidas en la fracción viral precipitada. El carril St corresponde a estándar de proteínas y sus tamaños en KDa se indican a la izquierda.

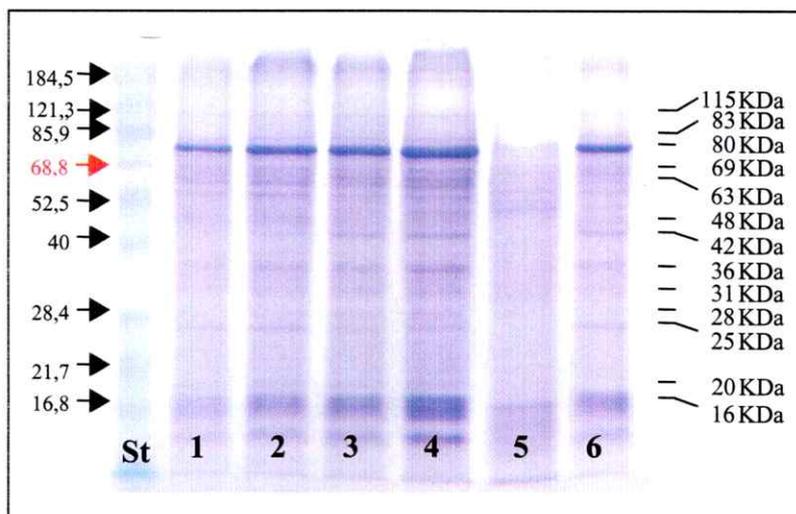


Figura 7: Proteínas del ISAV parcialmente purificadas mediante sedimentación en una gradiente de Ficoll.

Alícuotas de cada fracción se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 12,5%, 0,1% SDS. Posterior a la electroforesis las proteínas fueron teñidas con azul de Coomassie. (1) Banda obtenida de la gradiente de Ficoll (10 μ g), (2) Banda obtenida de la gradiente de Ficoll (20 μ g), (3) Precipitado obtenido de la gradiente de Ficoll (10 μ g), (4) Precipitado obtenido de la gradiente de Ficoll (20 μ g), (5) CHSE-214 sin infectar (10 μ g), (6) CHSE-214 infectadas con ISAV 10 μ g. Los números de la izquierda indican los tamaños de las proteínas del estándar (St) en KDa. Los números de la derecha indican el tamaño de las proteínas virales enriquecidas por gradiente de Ficoll.

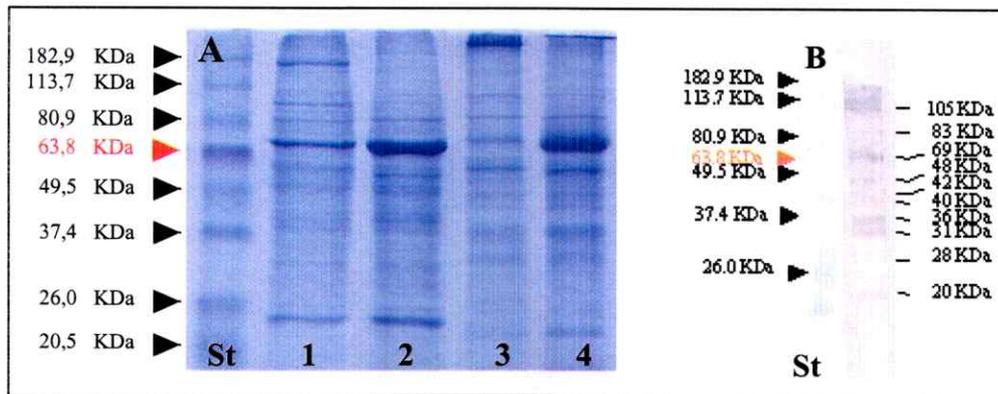


Figura 8: Proteínas de ISAV parcialmente purificadas mediante ultracentrifugación.

(A) Proteínas virales en condiciones reductoras y no reductoras resueltas en un gel de poliacrilamida al 12,5% en que se cargaron 20 μg de proteínas para cada muestra. Los carriles 1 y 2 corresponden al ultracentrifugado soluble y al ultracentrifugado no soluble y reducidas con β -mercaptoetanol (sección 2.1.7). Los carriles 3 y 4 corresponden a las mismas muestras, pero no reducidas con β -mercaptoetanol. (B) Western blot del ultracentrifugado soluble con un suero policlonal de ratón anti ISAV en condiciones reductoras .

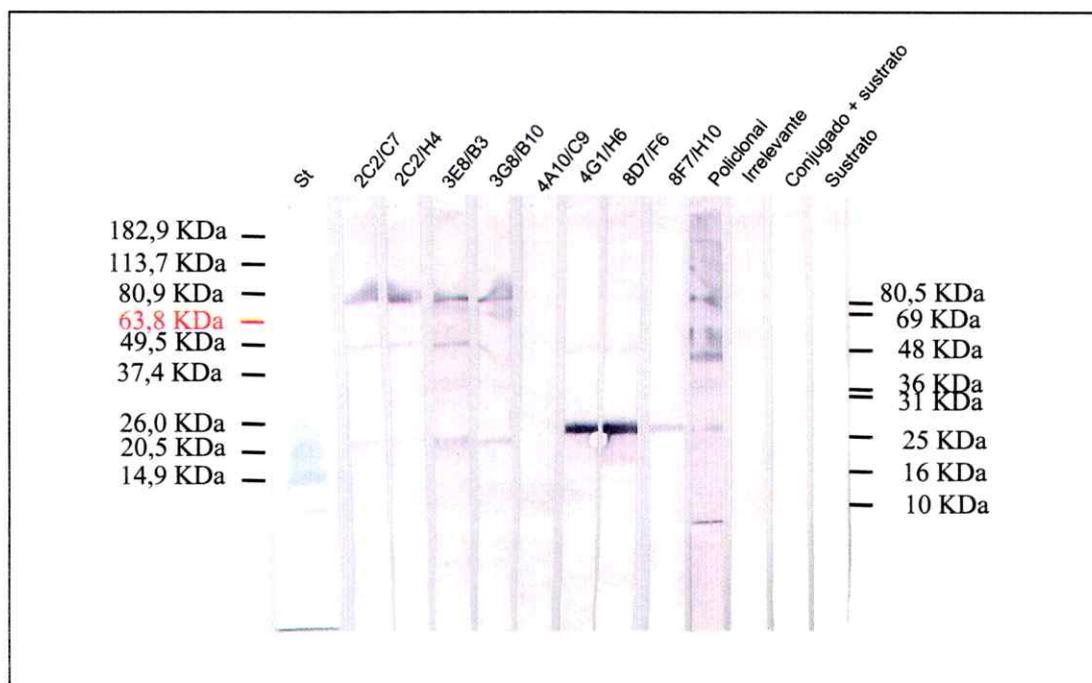


Figura 9: Proteínas de ISAV reconocidas por los AcMos.

Alrededor de 100 μ g totales de proteínas virales del ISAV obtenidas por ultracentrifugación, se disolvieron en un tampón con SDS, las cuales fueron separadas en un gel de poliacrilamida al 12,5% para realizar una electroforesis preparativa. Posterior a la electroforesis las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa, se bloquearon con caseína y sacarosa al 4% a temperatura ambiente. La membrana se cortó en tiras similares de alrededor de 5 mm y cada una de ellas fue incubada con los AcMos que se indican. Luego se incubaron con un segundo anticuerpo conjugado con fosfatasa alcalina y se realizaron los respectivos lavados, las membranas fueron reveladas (sección 2.3.2). Como controles negativos se incluyen un AcMo irrelevante, sin AcMo o sin el conjugado. Adicionalmente se incubó una tira con el suero policlonal producido en ratón. St, estándar de tamaño de proteínas en KDa.

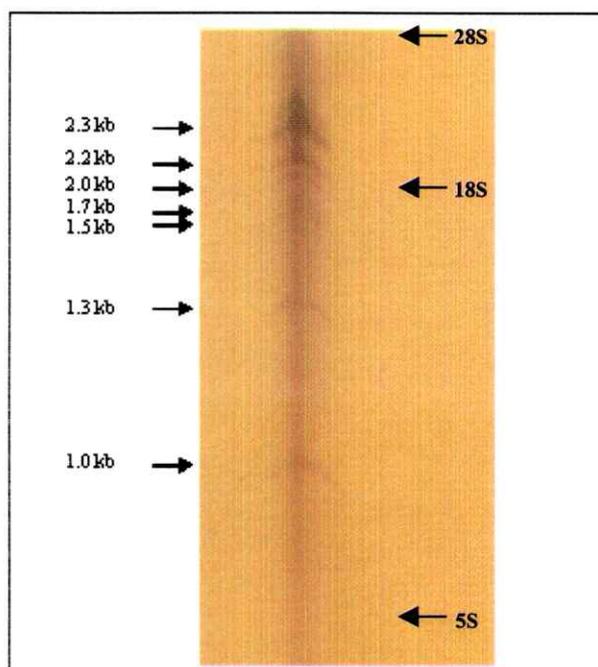


Figura 10: Análisis de los segmentos genómicos del ISAV.

El ARN total (3,72 μ g) del ISAV parcialmente purificado por ultracentrifugación se extrajo con Trizol-Is y se analizó mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida al 4%, 7M urea y teñido con plata. Se observan 7 bandas correspondientes a los tamaños que indican las flechas a la izquierda. En flechas de la derecha se muestran las migraciones correspondientes al ARN ribosomal de células CHSE-214.

3.6 análisis preliminar del ciclo replicativo de ISAV.

Además de constituir una excelente herramienta de diagnóstico, los AcMos ofrecen la oportunidad de analizar las distintas fases del ciclo replicativo del ISAV. Con este objetivo, células CHSE-214 fueron infectadas con el virus y la presencia del patógeno se determinó mediante inmunofluorescencia indirecta utilizando los diferentes AcMos caracterizados anteriormente. Por otro lado, para determinar las diferentes fases del ciclo replicativo, la detección del virus se realizó a distintos tiempos post infección.

El primer estudio consistió en detectar la presencia viral en células CHSE-214 a los 14 días post infección. Como se muestra en la Figura 11, los AcMos 2C2/C7, 3E8/B3, 8D7/F6 y 8F7/H10 produjeron una intensa fluorescencia. Por otro lado, con el AcMo 4A10/C9 se obtuvo una débil fluorescencia difícil de distinguir de los controles de células CHSE-214 no infectadas o infectadas con IPNV (dato no mostrado y Figura 11). En relación con la distribución de la fluorescencia esta varía entre los distintos AcMos, observándose fluorescencia preferentemente citoplasmática (2C2/C7, 4G1/H6 y 8F7/H10) o preferentemente nuclear (3E8/B3, 3G8/B10 y 8D7/F6) (Figura 11).

Como las diferentes localizaciones de la fluorescencia podría deberse a los distintos estados de ensamblaje del virus, se procedió a seguir la infección en células CHSE-214 a diferentes tiempos post infección, que variaron entre las 5 horas post infección a 10 días post infección, con cada uno de los AcMos. Estos resultados se ilustran con lo obtenido para el AcMo 2C2/C7, donde a las 5 horas post infección se encuentra una marca preferentemente asociada a la membrana celular (Figura 12) y que posteriormente pasa a una localización citoplasmática (1, 2 y 6 días post infección) y

nuclear a los 3 días post infección (Figura 12). A los 10 días post infección la inmunofluorescencia está predominantemente asociada de nuevo a la membrana celular (Figura 12). Esta localización diferencial se puede apreciar mejor a mayor aumento. Una distribución relativamente uniforme de la fluorescencia tanto en el núcleo como en el citoplasma se muestran en la las Figuras 13 y 14.

A los 2 días post infección, los AcMos 2C2/C7 y 2C2/H4 revelan un porcentaje bajo de células con una localización exclusivamente nuclear y que corresponde alrededor del 15% de las células positivas para la inmunofluorescencia. Similares resultados se obtuvieron con el AcMo 4G1/H6 a los 10 días post infección (Figura 15).

Sin embargo, lo más sorprendente fue el hallazgo de fluorescencia con una localización aparentemente nucleolar o con una estrecha asociación con el aparato de Golgi. Así por ejemplo, el AcMo 3G8/B10 a los 2 y 10 días post infección reveló en algunas células una definitiva marca nucleolar, lo cual también se observó con el AcMo 2C2/H4 a los 3 días post infección (Figura 16). Por otro lado, los AcMos 2C2/C7, 3G8/B10 y 8F7/H10 produjeron una señal fluorescente en una estructura membranosa asociada al núcleo, que probablemente corresponde al aparato de Golgi (Figura 17). En un bajo porcentaje de células, el AcMo 2C2/C7 también reveló la presencia de antígenos virales asociados a una estructura que podría corresponder al centrosoma (Figura 18).

Un resumen de las diferentes localizaciones de los antígenos virales durante la infección y ensamblaje de ISAV, detectados con el panel de AcMos se presenta en la tabla 4. En la tabla 5 se muestra el porcentaje del total de células positivas por inmunofluorescencia que muestra inmunoreactividad en el nucleolo con los AcMos 2C2/H4 y 3G8/B10.

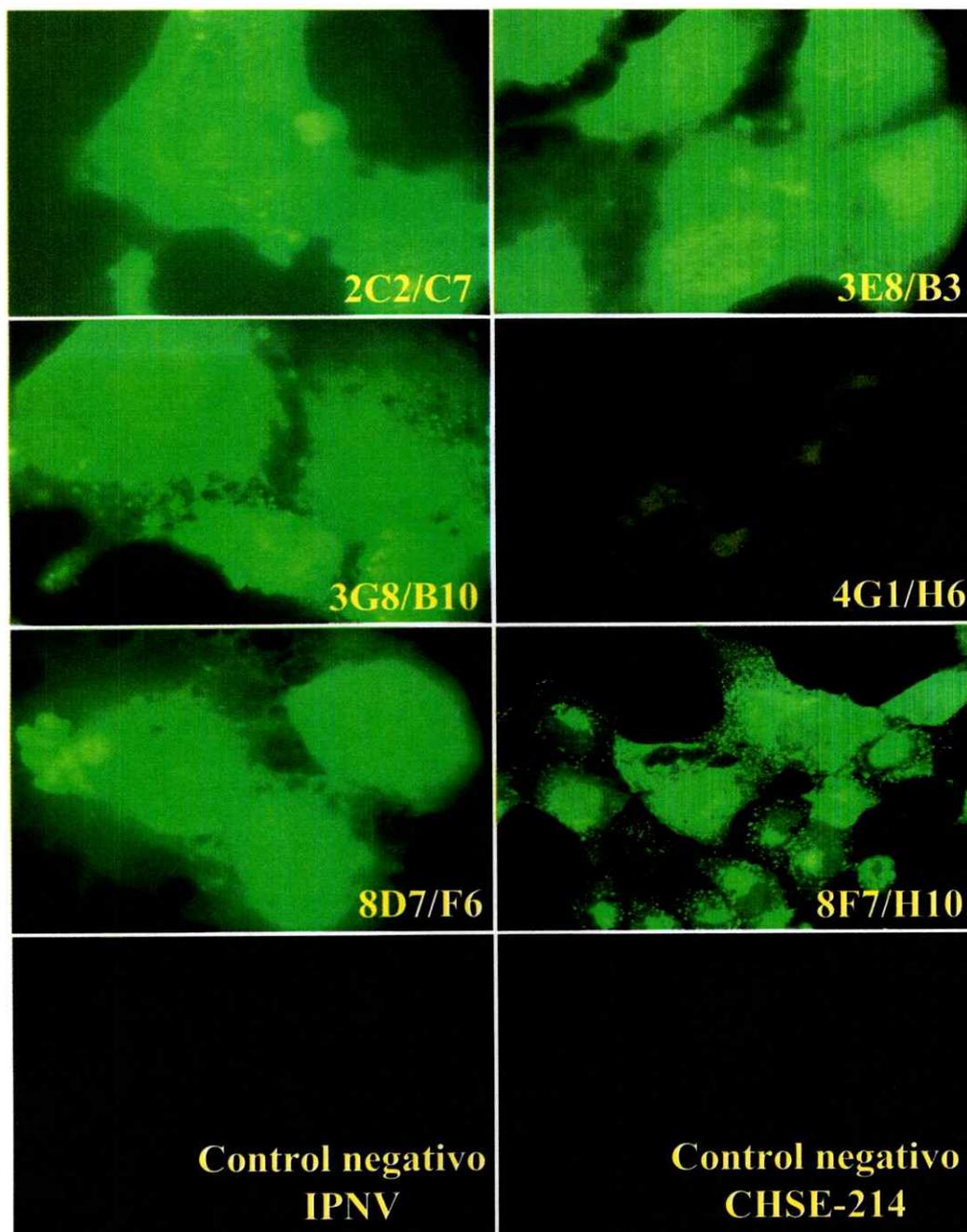


Figura 11 : Inmunofluorescencias del panel de AcMos anti ISAV.

Células CHSE-214 fueron infectadas con un clarificado del ISAV en dilución 1:10. Catorce días post infección (dpi) fueron fijadas, permeabilizadas e incubadas con los anticuerpos anti ISAV que se indican por 1 h, para luego ser reveladas con un policlonal anti IgG de ratón Fc específico conjugado con FITC. Como control negativo se muestran células CHSE-214 sin infectar y células CHSE-214 infectadas con IPNV, ambas reveladas con el AcMo 3E8/B3. Los demás AcMos tampoco mostraron inmunoreactividad contra las células CHSE-214 controles, ni contra IPNV.

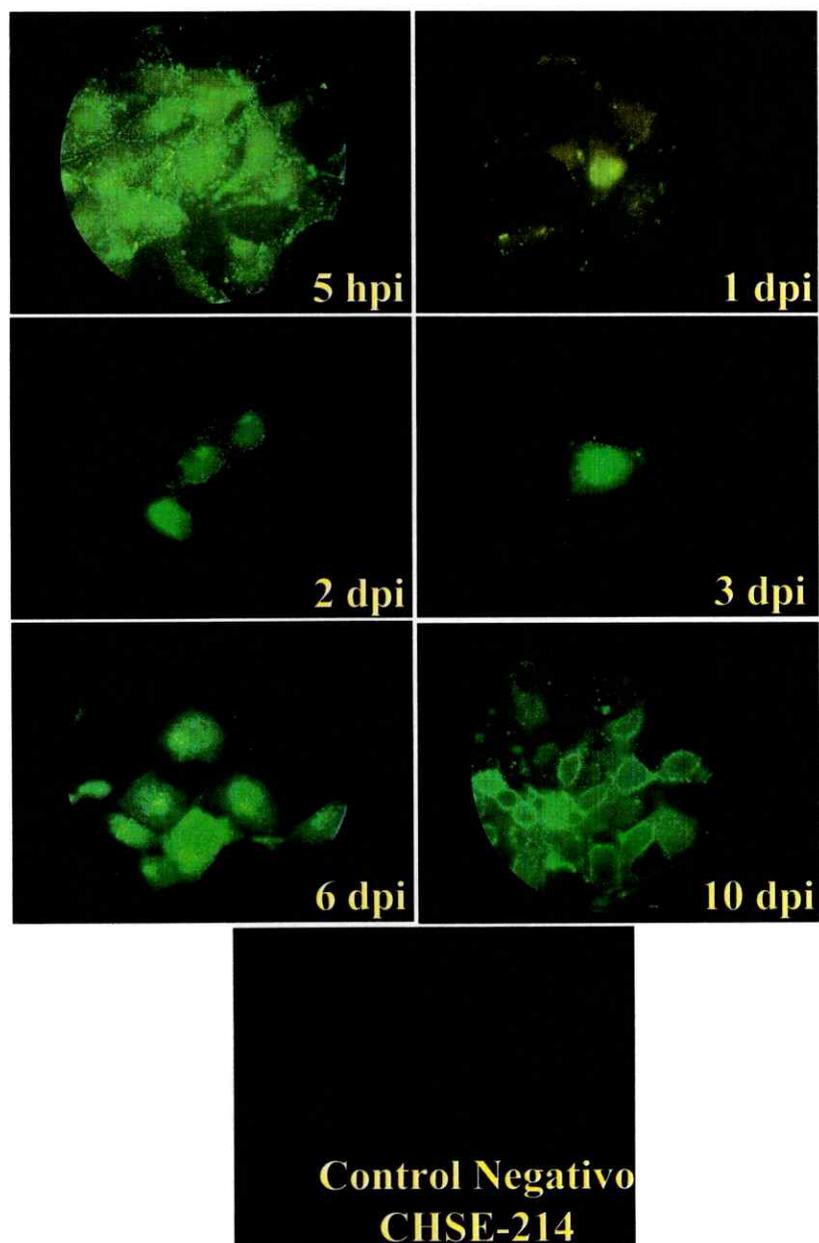


Figura 12: Inmunofluorescencia de células CHSE-214 con el ISAV.

Células CHSE-214 fueron infectadas con un clarificado del ISAV en dilución 1:10. A los tiempos post infección que se indican, las células fueron fijadas, permeabilizadas e incubadas con el AcMo 2C2/C7, para luego ser reveladas con un anti IgG de ratón Fc específico conjugado con FITC. En el extremo inferior derecho se indican los tiempos post infección. Como control negativo se utilizaron células CHSE-214 sin infectar.

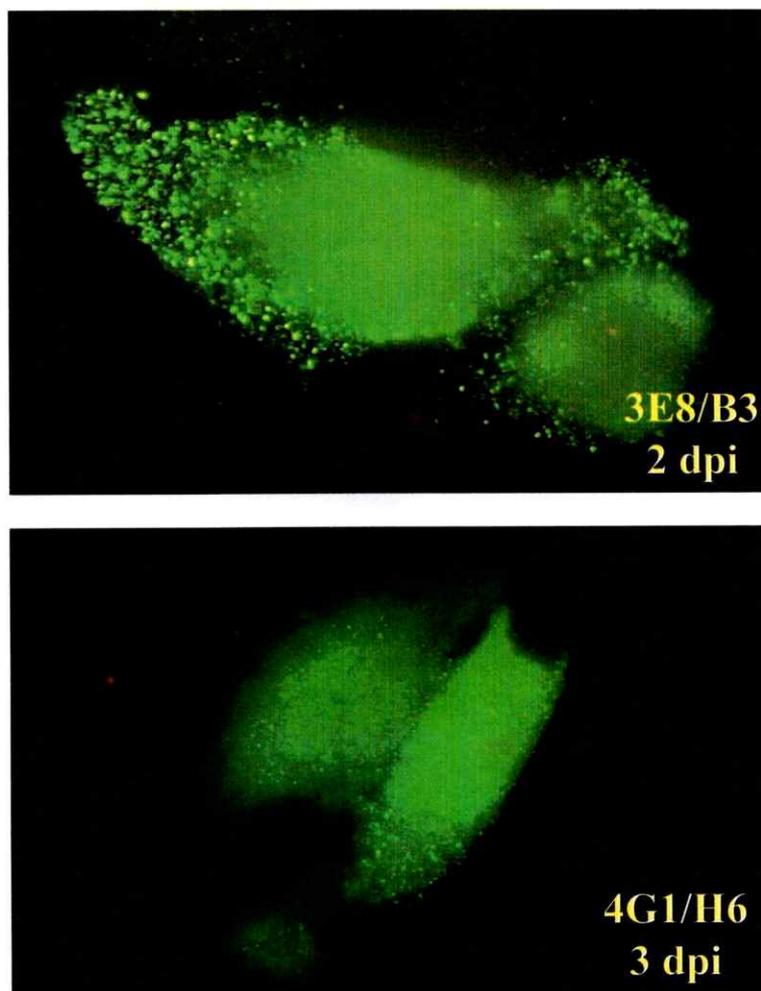


Figura 13: Inmunofluorescencia generalizada en células CHSE-214 infectadas con el ISAV.

La inmunofluorescencia se realizó como se describe en la Figura 11 con los AcMos 3E8/B3 y 2C2/H4 a los tiempos post infección indicados. La señal observada en el citoplasma es granular.

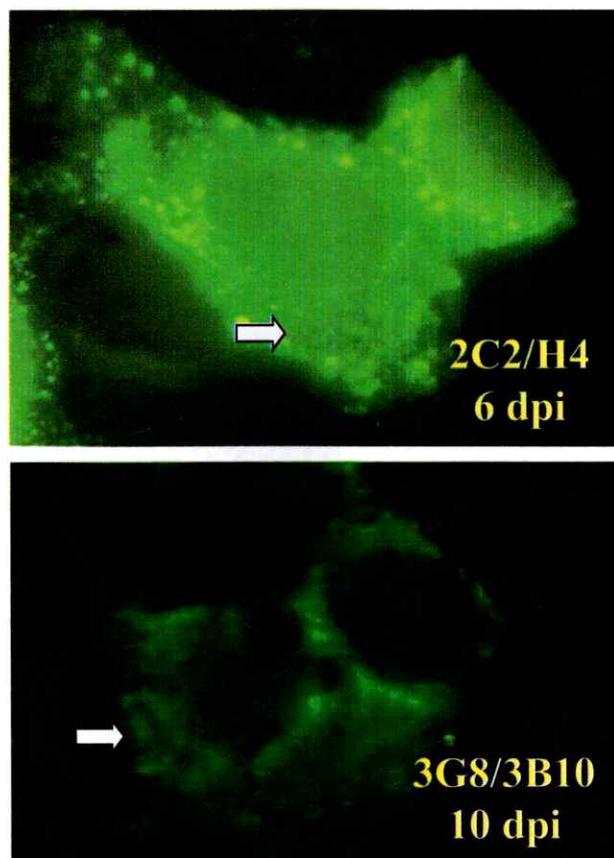


Figura 14: Localización aparentemente citoplasmática de proteínas del ISAV en células CHSE-214 infectadas.

La inmunofluorescencia muestra una localización preferentemente citoplasmática en algunas células a los 6 días post infección (dpi) y 10 días post infección al utilizar los AcMos 2C2/H4 y 3G8/B10. La señal citoplasmática es de tipo granular.

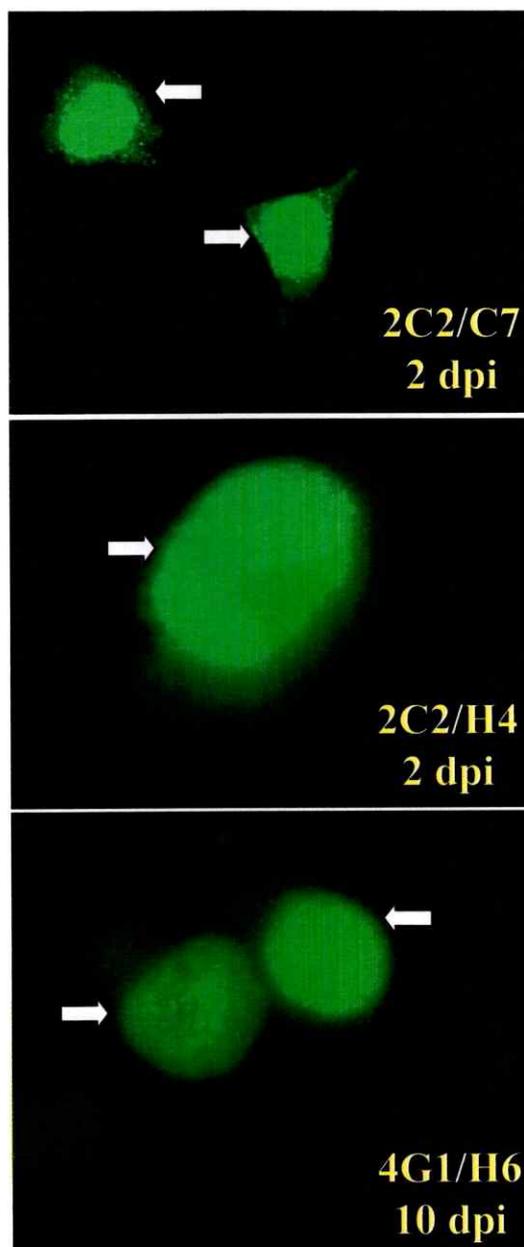


Figura 15: Localización nuclear de proteínas del ISAV.

Mediante inmunofluorescencia indirecta se encontró que los AcMos 2C2/C7, 2C2/H4 y 4G1/H6 a los tiempos post infección que se indican, mostraron una localización preferentemente nuclear. La señal fluorescente es homogénea y difusa en el núcleo.

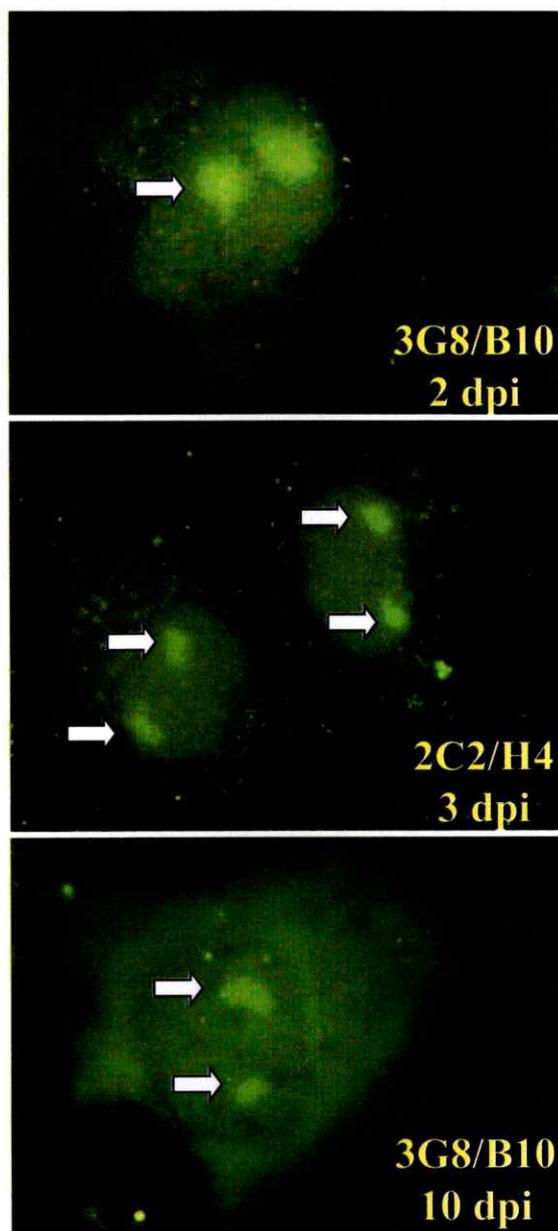


Figura 16: Localización aparentemente nucleolar de proteínas del ISAV.

Mediante inmunofluorescencia indirecta se encontró que los AcMos 3G8/B10 y 2C2/H4 eran capaces de detectar antígenos virales localizados en el nucleolo (flechas blancas) de las células CHSE-214 infectadas.

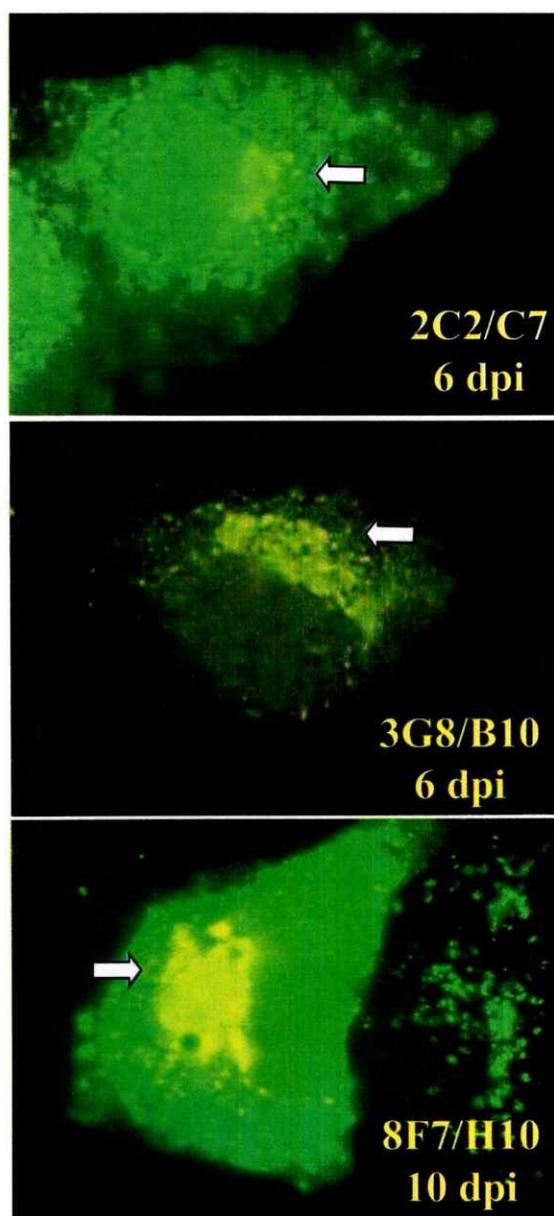


Figura 17: Localización aparentemente en el aparato de Golgi de proteínas del ISAV.

Mediante inmunofluorescencia indirecta se encontró que los AcMos 2C2/C7, 3G8/B10 y 8F7/H10 a los tiempos post infección indicados, detectaron antígenos virales asociados a estructuras que posiblemente corresponden al aparato de Golgi (flechas blancas).

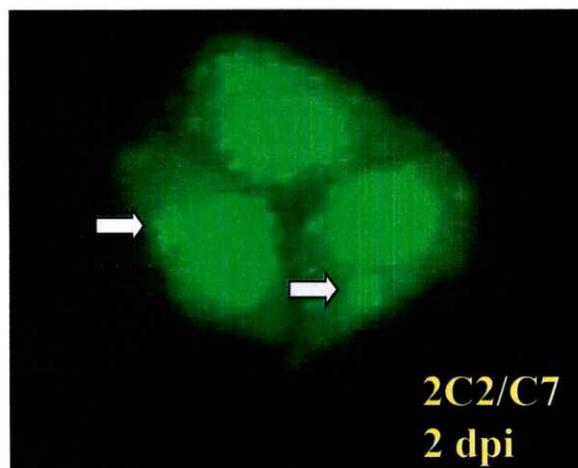


Figura 18: Localización aparentemente en los centrosomas de proteínas del ISAV.

Mediante inmunofluorescencia indirecta se encontró que el AcMo 2C2/C7 detecta en algunas células una localización de los antígenos del ISAV que podría corresponder a los centrosomas.

AcMo	Tipo de señal durante seguimiento de la infección		
	Temprana	Media	Tardía
2C2/C7	Gral/nuclear	Comp	Gral/citoplásmica
2C2/H4	Gral/nuclear	Comp	Gral/citoplásmica
3E8/B3	Gral	Gral	Gral/citoplásmica
3G8/B10	Gral/Compa	Gral/nuclear	Gral/Comp
4A10/C9	Sin señal	Sin señal	Sin señal
4G1/H6	Gral/nuclear	Gral/nuclear	Gral/nuclear
8D7/F6	Gral	Gral/nuclear	Gral/citoplásmica
8F7/H10	Gral/citoplásmica	Gral/polarizada	Polarizada/citoplásm

Tabla 4: Tipo de localizaciones observadas.

Resumen de los tipos de señales encontradas en el seguimiento de la infección con cada uno de los AcMos. Para cada período se describe la localización de la señal más representativa, lo cual no implica que no existan otros tipos de señalización. Señales nucleolar, centrosomal y perinuclear son agrupadas como compartimentalizada (Comp) cuando se presentan 2 o 3 de ellas en una misma célula por período. Una señal temprana corresponde a tiempos que van desde 5 hpi hasta 1 dpi, señal media tiempos que van desde 2 a 3 días post infección y señales tardías tiempos que van desde los 6 a 10 dpi.

AcMo	1 dpi	2 dpi	3 dpi
2C2/H4	13,2%	9,0%	13,9%
3G8/B10	9,7%	9,3%	9,8%

Tabla 5: Porcentaje de inmunoreactividad nucleolar de los AcMos 2C2/H4 y 3G8/B10.

A los días post infección (dpi) indicados se realizaron inmunofluorescencias con los AcMos señalados y se determinó el porcentaje de células positivas con señalización nucleolar.

3.7 Hibridación *in situ* (HIS).

Como se describió en la sección anterior, algunos de los AcMos anti ISAV mostraron una inmunofluorescencia asociada al nucleolo de las células CHSE-214. Los AcMos 2C2/H4 y 3G8/B10 reaccionan con proteínas virales que en alguna etapa del ciclo replicativo del ISAV se encuentran en el nucleolo. En general, alrededor de 9 a 13% de las células positivas para IFI mostraron inmunoreactividad en el nucleolo a diferentes días post infección (tabla 5). Por este motivo, fue importante conocer si el ARN viral también mostraba localización nucleolar. Con este objetivo se diseñaron sondas oligonucleotídicas que fueron sentido y antisentido respecto a la secuencia de los segmentos 2 y 6 del genoma viral (ADN complementario), las que se utilizaron para las HIS. Previamente las sondas se marcaron en el extremo 3' con dUTP-DIG como se describió en la sección 2.4.2.

Como se muestra en la Figura 19 A, la sonda antisentido para el segmento 6 del ISAV revela una fuerte localización nucleolar para este fragmento. Por otro lado, la sonda sentido para el mismo segmento genómico no detecta ARN en el núcleo o nucleolo, pero si en el citoplasma (Figura 19 B). Aunque más débiles, las señales de hibridación con sondas antisentido dirigidas contra el segmento 2 del virus, también revelan tinción nucleolar (Figura 19 C y D). Como control para las HIS se utilizaron sondas marcadas con DIG para el ARN 18S de salmonídeos. Como se aprecia en la Figura 19 E, la sonda anti sentido muestra una fuerte marca tanto en el nucleolo como en el citoplasma, mientras que la reacción con la sonda sentido fue negativa. En la Figura 20, se muestra la morfología nucleolar de las células CHSE-214, teñidos con Giemsa o azul de toluidina.

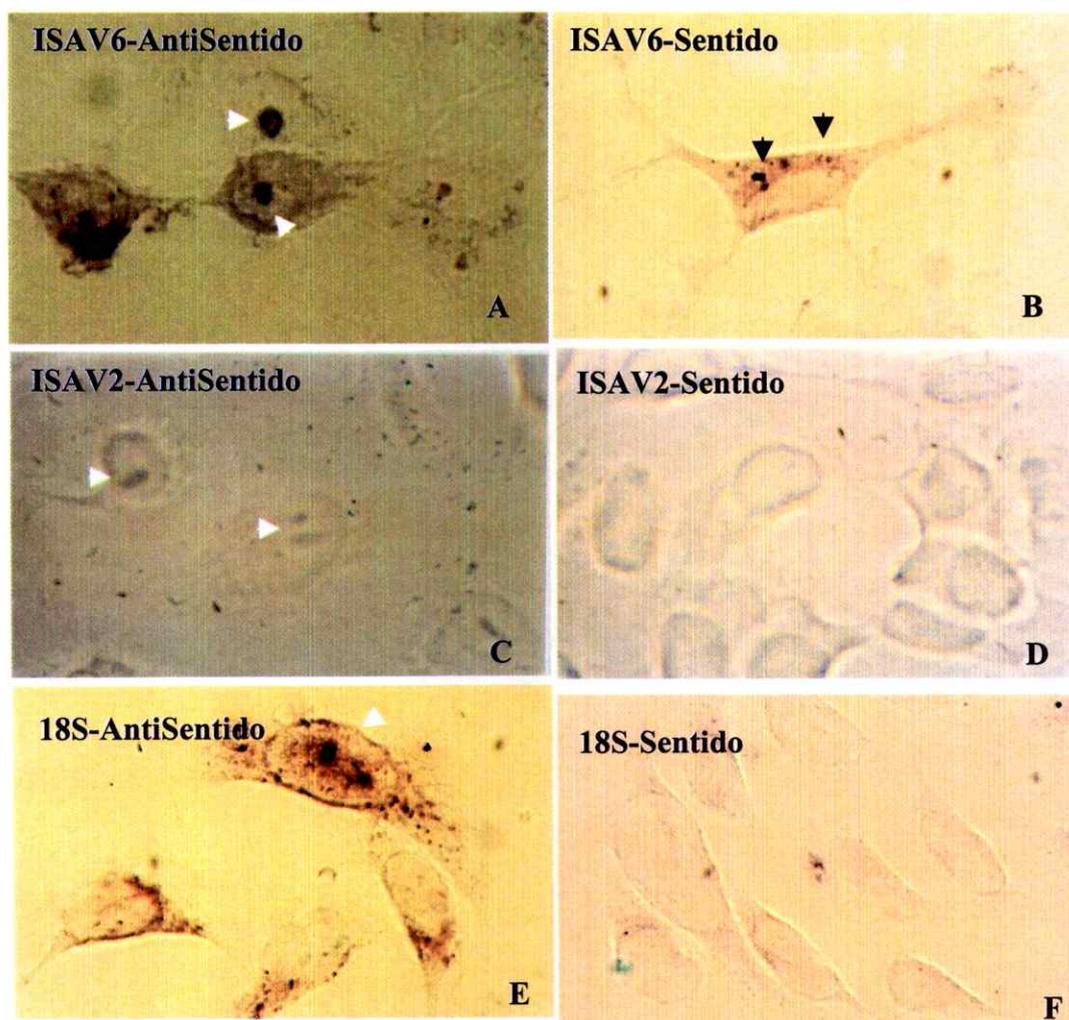


Figura 19: Localización de algunos segmentos del genoma de ISAV.

Células CHSE-214 a las 30 hpi con ISAV, fueron fijadas y sometidas a HIS con sondas marcadas con DIG. Hibridación con la sonda antisentido (A) o sentido (B) correspondiente al segmento 6 del genoma viral. Hibridación con la sonda antisentido (C) y sentido (D) para el segmento 2. Como referencia las células CHSE-214 fueron hibridadas con sondas antisentido (E) y sentido (F) correspondiente al ARN 18S. Las cabezas de flecha blanca indican la posición de los nucleolos. Las flechas en B muestran la tinción sólo en el citoplasma.

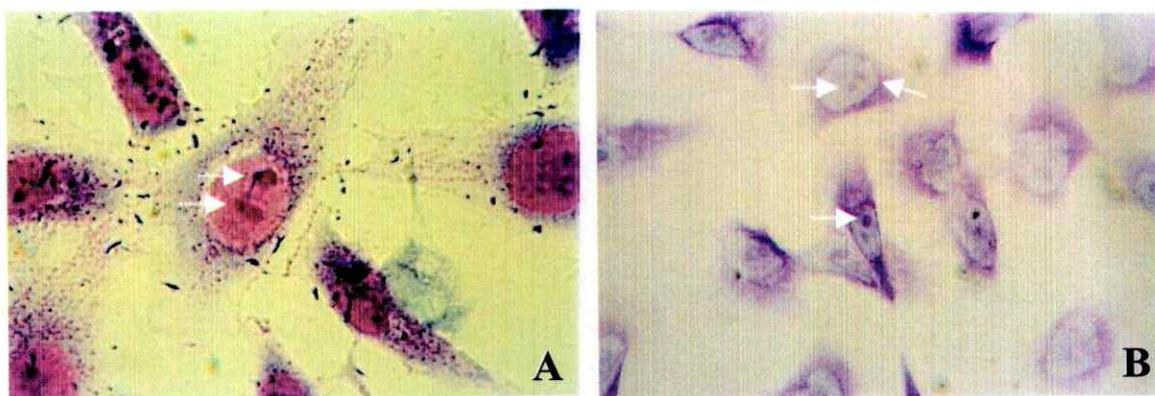


Figura 20: Morfología del nucleolo de células CHSE-214.

Células CHSE-214 se tiñieron con Giemsa (A) o con azul de toluidina (B). Las flechas indican la localización de algunos nucleolos.

3.8. Inmunoreactividad de los AcMos con tejidos de salmonídeos con síndrome icterico.

El ISAV clásico, presente en las costas de Noruega, Escocia, Irlanda y Canadá entre otros, ha sido recientemente detectado en Chile (Kibenge y cols., 2001a). En Chile existen indicios de un cuadro clínico semejante al generado por ISAV, en el cual los peces presentan anemia y marcada ictericia. Debido a que se han tenido algunas dificultades para cultivar y caracterizar mediante amplificación por RT-PCR el genoma de este supuesto ISAV, en general se ha acordado referirse a este como un "ISAV-like".

Por este motivo fue importante ensayar si tejidos de peces con síndrome icterico eran inmunoreactivos con los AcMos generados a partir de un aislado canadiense del ISAV. Con este objetivo se preparó una mezcla oligoclonal compuesta por 2C2/C7, 3E8/B3 y 8F7/H10, la cual se utilizó para detectar inmunoreactividad en improntas de riñón, hígado y bazo de salmonídeos con síndrome icterico provenientes del sur de Chile. Como se muestra en la Figura 21, riñones de peces con síndrome icterico muestran islotes de fluorescencia positiva.

En forma paralela, la mezcla oligoclonal se entregó a ADL Diagnostic Chile, de Castro, para que realizara un ensayo independiente. Las improntas se realizaron con tejido de salmones *coho* y *salar*. El resultado de esta evaluación se muestra en la tabla 6. Todos los peces controles que no presentaban síndrome icterico fueron negativos por IFI. De 22 muestras provenientes de peces con síndrome anémico o con ictericia, 12 (55%) mostraron fluorescencia positiva (tabla 6). Es interesante que en 2 improntas se encontró también marca fluorescente en el núcleo (tabla 6).

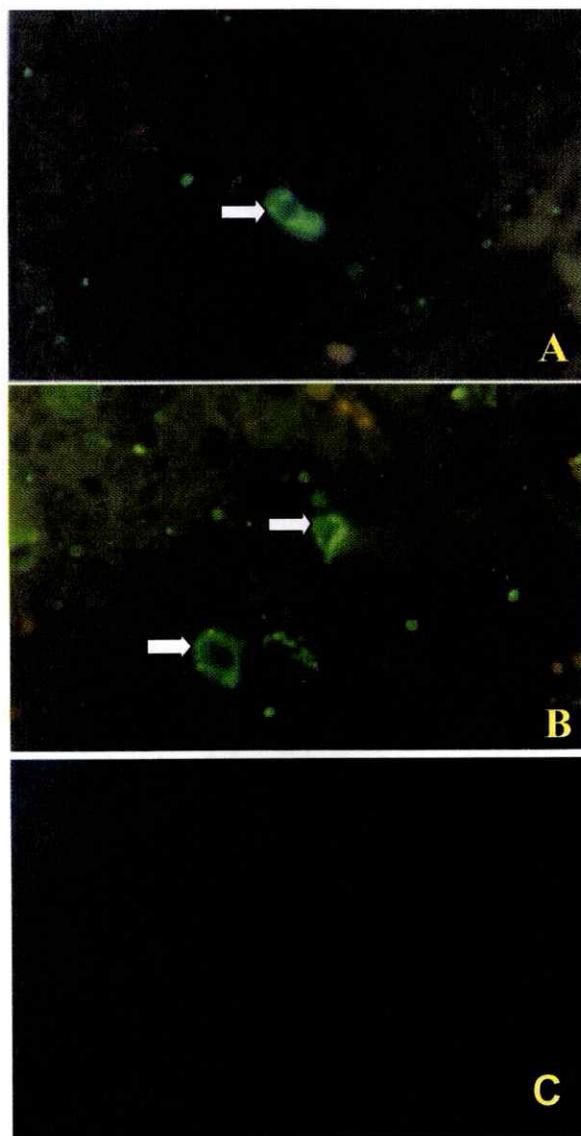


Figura 21: Inmunoreactividad en riñón de peces con síndrome icterico con una mezcla oligoclonal de AcMos anti ISAV.

Improntas de riñón de peces con síndrome icterico analizadas por inmunofluorescencia indirecta con una mezcla de los AcMos 2C2/C7 3E8/B3 y 8F7/H10. (A) y (B) Riñón de peces con síndrome icterico observado por epifluorescencia. (C) Tejido de riñón de peces sanos sin inmunoreactividad. Las flechas blancas indican células infectadas que son positivas con inmunofluorescencia.

Caso	Número	Especie	Cuerpo de agua	Inmunofluorescencia		Ictericia (Si/No)
				Nuclear	Citoplasmático	
A	1	Coho	Mar	N	N	No
A	2	Coho	Mar	N	N	No
A	3	Coho	Mar	N	N	No
A	4	Coho	Mar	N	N	No
A	5	Coho	Mar	N	N	No
B	1	Coho	Mar	N	N	No
C	1	Coho	Mar	N	N	No
C	2	Coho	Mar	N	N	No
D	1	Coho	Mar	N	N	No
D	2	Coho	Mar	N	N	No
D	3	Coho	Mar	N	N	No
D	4	Coho	Mar	N	N	No
D	5	Coho	Mar	N	N	No
E	1	Salar	Río	N	N	No
E	2	Salar	Río	N	N	No
E	3	Salar	Río	N	N	No
E	4	Salar	Río	N	N	No
E	5	Salar	Río	N	N	No
F	1	Coho	Mar	N	+1	Anémico
F	2	Coho	Mar	N	N	Anémico
G	1	Coho	Mar	N	N	No
H	1	Coho	Mar	N	N	No
H	2	Coho	Mar	N	N	No
H	3	Coho	Mar	N	N	No
I	1	Coho	Mar	N	N	No
I	2	Coho	Mar	N	+1	Si
J	1	Salar	Mar	N	N	Si
J	2	Salar	Mar	N	N	Si
J	3	Salar	Mar	N	N	Si
J	4	Salar	Mar	N	+2	Si
J	5	Salar	Mar	N	N	Si
J	6	Salar	Mar	N	+2	Si
K	1	Salar	Mar	N	N	Si
K	2	Salar	Mar	N	+1	Si
K	3	Salar	Mar	N	N	Si
K	4	Salar	Mar	N	N	Si
K	5	Salar	Mar	N	N	Si
K	6	Salar	Mar	N	+2	Si
K	7	Salar	Mar	N	N	Si
K	8	Salar	Mar	N	+1	Si
L	1	Coho	Mar	+1	+1	Si
L	2	Coho	Mar	N	+1	Si
L	3	Coho	Mar	N	+1	Si
L	4	Coho	Mar	+1	+2	Si
L	5	Coho	Mar	N	+1	Si

Tabla 6: Inmunofluorescencia indirecta de improntas de riñones de peces sanos y peces con síndrome icterico.

(N) negativo, (+1) menor a 5 células infectadas por cada 10 campos 100X, (+2) 5 a 20 células infectadas por cada 10 campos 100X.

4 DISCUSIÓN

A nivel mundial, la industria de salmones cultivados ha tenido un explosivo aumento. Así por ejemplo, la producción mundial de salmones y truchas cultivadas eran 366 mil toneladas en 1990, la cual casi se ha cuadruplicado en los últimos 12 años, llegando a 1.445.000 toneladas en el 2002. En este período, Chile ha sido el país que ha reportado un mayor incremento en la producción de salmonídeos. En el 2002 se produjeron en el país 506 mil toneladas comparadas con las 29 mil toneladas en 1990, lo cual representa el 35% de la producción mundial, ubicándose en el segundo lugar después Noruega, que tiene el 36,7% del total para el mismo año (http://www.salmonchile.cl/estadisticas/tabla4_2.htm). Este enorme volumen de salmonídeos se tradujo a exportaciones por 973 millones de dólares FOB y representó el 50% de las exportaciones del sector pesquero nacional en el 2002 (http://www.salmonchile.cl/estadisticas/tabla2_2.htm). Dados estos antecedentes, resulta evidente el interés nacional que tiene este sector económico, donde además por los tratados de libre comercio recientemente firmados, se estiman incrementos de estos productos y sus derivados. En este punto, resulta vital el manejo adecuado de todos los agentes epizoóticos que afectan a la industria nacional y estar alerta frente a aquellos patógenos que, si bien hasta la fecha no han sido detectados en Chile, si han generado serios problemas en países productores del hemisferio norte. Se estima que más de un 10% de todos los animales acuáticos cultivados se pierden como consecuencia de enfermedades infecciosas. Por ejemplo, en EE.UU. la Agrupación de Productores de Trucha calculó en 1991 que de 68,9 millones de peces cultivados, 30,8 millones

murieron por infecciones, lo que representa un 52% de pérdidas en la producción de esta especie (ProChile New York, 2003).

Uno de los patógenos que recientemente se ha detectado en nuestro país, es el virus de la anemia infecciosa del salmón (ISAV), virus que en el hemisferio norte ha causado enormes pérdidas. Así por ejemplo, existen registros para Noruega con pérdidas por US\$ 11 millones en 1999, Canadá con US\$ 14 millones en 1999 y Escocia US\$ 32 millones entre 1998 y 1999 (Murray y cols., 2002). El impacto económico subsiguiente a la enfermedad, no se limita a la muerte del pez, sino que a otros factores tales como escoliosis, pérdida de peso y tamaño comercial que influyen en el precio de mercado de los sobrevivientes. Por lo tanto, es obvia la preocupación que existe entre los salmicultores nacionales e internacionales por este virus, así como disponer de herramientas que permitan un rápido, oportuno y eficiente diagnóstico y en segundo lugar, el desarrollo de métodos profilácticos y preventivos contra la enfermedad.

En 2001, Kibenge y sus colaboradores publicaron el aislamiento y caracterización de un aislado del ISAV proveniente de un centro de engorda nacional, lo que representó la primera confirmación de la presencia de este virus en nuestro país. Anteriormente, se tenían fuertes sospechas por la presencia de peces que presentaban síndrome icterico entre otras señales clínicas, las cuales sin embargo, son también producidas por otros agentes infecciosos. Estas sospechas que indicaban la presencia de brotes epidémicos de un supuesto ISAV se produjeron en juveniles del salmón Atlántico, variedad de alta prevalencia en Chile. Si bien se ha visto que este virus ha sido capaz de replicar en otros salmonídeos, no se habían registrado señales clínicas en otras especies (Danneving y cols., 1995a). Sin embargo, en Chile el aislado se obtuvo a partir de

salmón Coho, con las correspondientes señales clínicas y mortalidades. Este aislado presentó algunas diferencias con los aislados canadienses y europeos, como fue la ausencia de CPE en células SHK-1 y en células CHSE-214 el CPE se desarrolló muy lentamente. La presencia viral se confirmó por RT-PCR. Además se observó una débil señal por inmunofluorescencia con un suero anti ISAV desarrollado en conejo (Kibenge y cols., 2001a). Análisis de las secuencias genómicas de los segmentos 2 y 8, que codifican para putativas PB1 y NS1/NS2, reveló una alta homología con el virus canadiense (Kibenge y cols., 2001a). Más recientemente, se han detectado en diferentes centros de cultivo, brotes de un cuadro clínico con fuerte anemia y severa ictericia. Estos hallazgos se han mantenido con muy bajo perfil, debido a los problemas de seguros que se generarían para las empresas salmonicultoras. Se sospecha que el agente causante de este cuadro clínico sería el ISAV. Sin embargo y a diferencia del reportado por Kibenge y colaboradores (2001), este supuesto virus no genera CPE en células SHK-1 ni en CHSE-214. Además, y utilizando varias parejas de partidores para RT-PCR, no ha sido posible amplificar el genoma viral (comunicación personal de G. Parada, Fundación Chile). Por esta razón, a este agente infeccioso se le ha denominado "ISAV-like".

Como existen dificultades para la identificación del "ISAV-like", desarrollar un sistema de diagnóstico específico y sensible, es de suma urgencia ya que a menudo los virus inducen infecciones persistentes y los sobrevivientes de una epizootia se convierten en portadores del virus durante largos períodos o toda su vida, contribuyendo a una rápida dispersión. Por otro lado, la enfermedad causada por ISAV no tiene tratamiento y los agentes antivirales viables no proporcionan grandes descensos en las

tasas de mortalidad y su costo y eficacia los invalidan para cualquier uso práctico en acuicultura. Por lo tanto, un sistema de diagnóstico y detección temprana de ISAV o "ISAV-like" es vital, no sólo para evitar el importe de ovas infectadas, si no también para frenar una dispersión dentro y entre los centros de cultivo.

En este sentido, los métodos de diagnósticos basados en RT-PCR y AcMos específicos contra ISAV, son una excelente herramienta. Poder evaluar prontamente, con una alta sensibilidad y especificidad para el aislado chileno (Figura 21), además de otros aislados (canadiense) es una característica importante del panel de AcMos desarrollados en esta tesis, lo que permitiría el diagnóstico tanto en brotes nacionales como de ovas importadas.

Dada la relevancia de los AcMos como herramienta en el diagnóstico, se preparó un panel de AcMos anti ISAV, desarrollados a partir de un aislado canadiense (New Brunswick). Estos anticuerpos fueron caracterizados y probados en distintos ensayos, como Western blot (Figura 9), inmunofluorescencias en cultivo celular (Figuras 11 a 18) como en tejidos de peces con síndrome icterico (Figura 21), arrojando resultados positivos para todos ellos. Para inmunizar los ratones se utilizó una fracción viral enriquecida mediante ultracentrifugación. La sedimentación por ultracentrifugación resultó en una fracción concentrada del virus. Los análisis realizados a través de electroforesis en geles de poliacrilamida, revelan proteínas mayoritarias de los tamaños descritos por Clouthier para el virus (20, 28, 42, 48, 69 y 83 KDa, Figura 8). Los métodos utilizados para purificar el virus como gradiente de Ficoll o precipitación con PEG 8.000 no dieron buenos resultados, ya que la fracción viral, parecía tener

contaminante de células CHSE-214 y productos de degradación. En cuanto al genoma viral del purificado por ultracentrifugación, se identificaron siete bandas discretas por tinción de plata en un gel de poliacrilamida (Figura 10). El tamaño de estos segmentos se encuentra en el rango descrito (Mjaaland y cols.,1997) y es evidente que el fragmento de mayor tamaño genera una banda de al menos el doble de la intensidad comparada con los seis restantes, ya que el gel no lograría resolver los dos fragmentos más grandes que poseen un tamaño similar de 2,3 kb, resultado que también se ha descrito en la literatura (Mjaaland y cols.,1997). Si bien para la identificación de los segmentos virales se requirió bastante virus (alrededor de 4×10^{11} partículas virales), esta metodología nos permitió confirmar que el virus tenía un genoma fragmentado típico de los orthomyxoviridae, sin tener que utilizar ^{32}P , infraestructura no disponibles en nuestro laboratorio.

En la caracterización de estos AcMos anti ISAV, se pudo observar diferencias claras entre los distintos anticuerpos, tanto en la sublocalización celular de la señal, como en las distintas etapas del desarrollo del ciclo infeccioso en células CHSE-214 (Figuras 11 a la 18). Conocer el ciclo infeccioso del virus, puede ser de gran ayuda para realizar una detección adecuada del patógeno, conociendo además las características de cada uno de los distintos AcMos, se pueden potenciar en su capacidad de diagnóstico.

Para la interpretación de los resultados del seguimiento de la infección por IFI, hay que tener en consideración, que el cultivo no es sincrónico, que las células se encuentran en distintas etapas del ciclo celular y por lo tanto, pueden presentar sensibilidades diferentes a la infección y replicación viral. Por este motivo, fue necesario observar gran cantidad de células y las fotografías que se presentan en este trabajo

muestran aquellos estadíos más representativos de cada tiempo post infección. Se pudo apreciar diferencias en las señales mostradas con los AcMos, lo cual es reflejo de un reconocimiento de distintas proteínas virales, o epitopos, las que podrían tener señales de destinación específicas para algunos organelos celulares.

Debido a las dificultades encontradas para obtener muestras sospechosas del ISAV en las pisciculturas nacionales y a que se ha reportado una baja o nula replicación del virus nacional en células CHSE-214 y SHK-1 (Kibenge y cols., 2001a), se optó por trabajar con un aislado canadiense (New Brunswick), el cual fue crecido en células CHSE-214 y SHK-1. Por los mejores resultados obtenidos con la primera línea celular, se escogió esta para realizar los estudios (datos no mostrados). Los títulos obtenidos fueron bastantes similares a los reportados en la literatura. Tradicionalmente el TCID₅₀ se estima observando el CPE producido por el patógeno en la línea celular hospedera cultivada en placas de 96 pozos. Para el caso del ISAV, donde el CPE es lento en células CHSE-214, se desarrolló un método que permite visualizar tempranamente células infectadas por el virus a través de un ensayo de IFI empleando AcMos, disminuyendo en el menos un tercio el tiempo necesario para el ensayo respecto al método tradicional. Se logró además, una lectura confiable y sensible comparable a los resultados obtenidos por RT-PCR.

Los AcMos fueron ensayados además de inmunofluorescencia y de Western blot, por un ensayo de ELISA (datos no mostrados). Todos ellos mostraron buena inmunoreactividad y el ELISA fue además, el método utilizado para seleccionar los clones positivos para el virus. Sin embargo, se encontró distintos grados de inmunoreactividad con cada uno de ellos. Así por ejemplo, en ensayos de ELISA el

AcMo 4A10/C9 presentó la mayor inmunoreactividad, sin embargo no presentó reacción ni por inmunofluorescencia ni por Western blot. Esto se podría explicar por un reconocimiento conformacional del antígeno y por este motivo, no es reconocido en Western blot. La ausencia de señal por IFI, se puede deber a la fijación química que se hace con paraformaldehído, que puede estar enmascarando el epitopo de reconocimiento, hecho que no ocurriría en el ELISA donde se tiene una bioadhesión. De este modo es clara la importancia del desarrollo de este panel de AcMos, no sólo para el desarrollo de los estudios aquí realizados, sino también para su utilización en el desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico. Dependiendo de la naturaleza de estos, y basándose en los resultados aquí mostrados, se deberán escoger aquellos AcMos que presenten una mejor inmunoreactividad para cada tipo de ensayo.

Aunque no fue posible determinar categóricamente que proteína viral está siendo reconocida por cada uno de los AcMos, si se puede inferir para algunos AcMos cual es su posible antígeno. Así se postula que el AcMo 4G1/H6 podría reconocer a la proteína NS1, la cual en la literatura ha sido descrita con un tamaño de 26,5 KDa (Cluothier y cols., 2002) cercano a la proteína de 25 KDa que reconoce por Western blot. Además, por el seguimiento mediante inmunofluorescencia esta proteína presenta un comportamiento similar al descrito para este AcMo. Esta fosfoproteína, presenta dos tipos de localización, uno en el núcleo, donde estaría involucrada en el splicing y exportación del mRNA y otra localización tardía en el citoplasma asociado a polisomas (Enami, 1997), similar a la inmunoreactividad encontrada en esta tesis.

Por otro lado el AcMo 8F7/H10 estaría reconociendo una proteína citoplasmática que no va al núcleo. Estas proteínas podrían ser tanto la HA como la acetil esterasa, las

cuales además son glicoproteínas. La señal polarizada que se observa con este AcMo cercana al núcleo podría corresponder al aparato de Golgi, donde ocurre la glicosilación. Al observar el Western blot (Figura 9), se observa que este AcMo reconoce una banda de 25 KDa, la cual puede corresponder a uno de los péptidos de la hemaglutinina, ya que esta proteína está formada por las subunidades HA₁ y HA₂ unidos por un puente disulfuro) (<http://www-micro.msb.le.ac.uk/335/Orthomyxoviruses.html>) y (Steinhauer, 1999). En este punto es interesante notar que ambos AcMos, 4G1/H6 y 8F7/H10, deberían estar reconociendo proteínas virales diferentes ya que muestran no sólo señales, sino también cinéticas distintas.

El AcMo 3G8/B10 reconoce una proteína de alrededor de 70 KDa (Figura 9), tamaño que concuerda con el descrito para la NP de 68 KDa (Clouthier y cols., 2002). La señal observada por IFI es concordante con lo descrito en la literatura (Portela & Digard, 2002) ya que se tiene una señal temprana nuclear y otra tardía citoplasmática. Para identificar claramente que proteína es la que está siendo reconocida por cada AcMo, a futuro las partículas virales se purificarán por inmunoprecipitación con partículas de látex recubiertas con AcMo anti ISAV y las proteínas virales se analizarán por electroforesis en geles de poliacrilamida. Sin embargo, estos esfuerzos estarán dirigidos a las proteínas del "ISAV-like".

Dependiendo del AcMo utilizado en el seguimiento de la infección, fue posible encontrar señales positivas de inmunofluorescencia a partir de las 5 horas post infección, con los AcMos 2C2/C7 y 2C2/H4. Sin embargo, lo general fue encontrar señal a partir de 1 día post infección, siendo el AcMo 4G1/H6 el que presentó una inmunofluorescencia más tardía, apareciendo una buena señal a partir de los 2 días post

infección. Esto podría explicarse por el reconocimiento de un epitopo poco representado o por estar reconociendo a alguna proteína viral que no forma parte de la partícula viral propiamente tal, como es NS1. Entre los 3 y 6 días post infección se obtuvo un alto porcentaje, cercano al 70% de las células inmunoreactivas. A tiempos mayores, si bien se sigue observando bastante inmunofluorescencia, se comienza a perder lentamente, principalmente por desprendimiento y lisis celular.

Fue interesante encontrar durante los ensayos de seguimientos de la infección, que algunos de los AcMos generaron inmunofluorescencia en compartimentos subcelulares. El hallazgo más sorprendente fue la señal asociada a una estructura al interior del núcleo, la que postulamos como nucleolar. Los AcMos que dieron un mayor porcentaje de este tipo de señalización temprana, fueron el 2C2/C7, 2C2/H4 y el 3G8/B10, que revelaron que entre un 11 y un 13% de las células infectadas mostraban inmunoreactividad en el nucleolo. A pesar que existen varios virus que durante su replicación algunas de sus proteínas se localizan en el nucleolo, en el esquema más aceptado para los orthomyxovirus no se describe ningún paso por este compartimento subnuclear (Figura 2), aunque si hay algunos reportes que describen a la NP de influenza A en algún compartimento subnuclear, pero sin mostrar colocalización con antígenos nucleolares (Hiscox, 2002). A futuro será interesante mostrar colocalización de estos AcMos con proteína ubicuas del nucleolo como es la nucleolina. Estos resultados sugirieron que al menos una proteína viral se localizaba en el nucleolo durante alguna etapa del ciclo replicativo del virus. Por lo tanto, la etapa siguiente fue determinar si el genoma del virus también mostraba la misma localización. Con este objetivo, se realizaron HIS con sondas antisentido y sentido para la hebra 6 positiva del genoma viral

y marcados con DIG. La sonda antisentido hibrida con el mARN del virus y con el antigenoma, mientras que la sonda sentido lo hace con el ARN negativo o genómico del virus. Los resultados mostraron que el ARN positivo se localizaba en el nucleolo, mientras que el ARN genómico se localizaba fundamentalmente en el citoplasma. Similares resultados se obtuvieron con sondas dirigidas contra el segmento 2 del genoma viral, aunque la intensidad de la marca fue más débil. La localización descrita, coincide con la localización del ARN 18S de las células CHSE-214. Por lo tanto, en el ciclo replicativo del virus, el ARN positivo o mARN viral, correspondiente a los segmentos 2 y 6 tendría una fase de localización nucleolar. Aunque falta trabajo por realizar, podría tentativamente proponerse que la localización nucleolar sería necesaria para el ensamblaje del polisoma correspondiente o en una etapa temprana y previa a la transcripción del ARN negativo o del genoma viral. Otra alternativa plausible es que este ARN positivo corresponda al anti genoma viral, utilizado como templado para la síntesis de nuevos segmentos virales.

Las señales de localización nucleolar caracterizadas por secuencias ricas en aminoácidos básicos (Lys y Arg) han sido encontradas en varias proteínas virales, como por ejemplo, en las proteínas Rev del virus de la inmunodeficiencia (HIV), Rex de virus de la leucemia humana de células T (HTLV-1), MEQ del virus de la enfermedad de Marek y NI/114L del virus de la fiebre africana de los cisnes (Cheng y cols., 2002). Más aún, los resultados publicados por Cheng y colaboradores indican que un dominio amino-terminal de la proteína $\gamma_{134,5}$ contiene señal de localización nucleolar mientras que la señal de localización nuclear se encontraría en el extremo carboxiterminal. Al

hacer un análisis de las secuencias aminoacídicas de las proteínas del ISAV disponibles en NCBI, se encontraron posibles secuencias del tipo secuencia señal nucleolar en la proteína NS2 (secuencia de acceso AF 404340) formada por 5 residuos básicos ubicados en el N-terminal (aminoácidos 17 al 21), mientras que NS1 (secuencia de acceso AF 404340) posee una secuencia en el C-terminal rica en aminoácidos básicos, formando una señal bipartita semejante a las secuencias de NS2 (resultados no mostrados). Así, NS1 del ISAV podría ser una proteína que se localice en el nucleolo en algún estadio de la infección por ISAV. Para esta proteína no existe aún una función conocida, sin embargo se postula que podría actuar como adaptador molecular entre la maquinaria de exportación nuclear y el complejo ribonucleoproteico del virus, lo cual no discrepa con una localización nucleolar (Lommer & Lou, 2002).

Encontrar proteínas con señales de destinación subcelular en los virus no es extraño. Así para una ubicación nucleolar encontramos que los Coronavirus, tienen una localización nucleolar para la NP y su función podría radicar en la interrupción de la división celular (Wurm y cols., 2001). Sin embargo, el ejemplo clásico se encuentra en el virus de la enfermedad de Borna (BDV), perteneciente a la familia de los paramyxovirus, familia que se diferencia de los orthomyxovirus en la segmentación del genoma. En los BDV se ha visto que el nucleolo estaría involucrado en la síntesis del ARN viral y también en el proceso replicativo, al encontrarse en el organelo tanto el ARN genómico como el complementario, es decir, el mARN como el antígenómico (Pyper y cols., 1998).

La localización de algunas proteínas en el Golgi era más esperable, ya que al menos las proteínas HA y acetilesterasa de ISAV son glicosiladas, evento que ocurre en

este compartimento celular. Al hacer un análisis en PROSITE (<http://us.expasy.org/prosite/>), para las glicosilaciones de ambas proteínas virales, se encontró que ambas proteínas poseían dos posibles sitios de N-glicosilación. No obstante esto, no se puede descartar alguna otra función de las proteínas virales en Golgi. Para confirmar definitivamente esta ubicación se deberán realizar a futuro colocalizaciones con marcadores de Golgi como un anti 58K o un anti-galactosil transferasa.

Al comparar la localización en el Golgi de algunas proteínas del ISAV, con lo que acontece en otros virus, se ha encontrado que en la familia de los bunyaviridae (virus Hanta) existe retención de glicoproteínas virales en Golgi, lo cual se piensa que tendría una función en su maduración (Spiropoulou y cols., 2003). Algo similar se observa para el virus de la Hepatitis C, donde se ha visto que el aparato de Golgi tendría un activo desempeño tanto en el ensamblaje como en la morfogénesis viral (Sarafino y cols., 2003). Sin embargo, parece más interesante aún lo que ocurre con la proteína E5 de los virus papiloma, la cual se localiza en el aparato de Golgi, y otros compartimentos endomembranosos, donde prevendría el transporte a la superficie celular de MHC-I, evitando de este modo la presentación de péptidos virales al sistema inmune (Marchetti y cols., 2002).

Otra localización sorprendente, aunque aún preliminar, es la inmunofluorescencia asociada a un organelo perinuclear. Por su tamaño relativo y su cercanía al núcleo, pareciera ser el centrosoma. El porcentaje de células que presentaron esta marca 1 día post infección fue de 10 y 12% con los AcMos 2C2/C7 y 3G8/B10, respectivamente. Sin embargo, para confirmar estos resultados, habrá que realizar

colocalizaciones con marcadores para el centrosoma. Recientemente, nos conseguimos con el Dr. Stephen Doxsey, de la Universidad de Harvard, un suero de un paciente con escleroderma. Este suero autoinmune, permitirá a futuro, realizar experimentos de colocalización

En cuanto a los centrosomas se ha visto por ejemplo que la proteína Gag de los retrovirus tendría como blanco a una región pericentrosomal, dirigiéndose de este modo al centro organizador de microtúbulos previo a su translocación nuclear (Petit y cols., 2003). En los papilomavirus, se ha encontrado que 2 oncoproteínas, las proteínas E6 y E7, inducirían números anormales de centrosomas promoviendo así, inestabilidad genómica (Duensing y cols., 2000 y Duensing & Munger, 2002).

El centrosoma no sólo cumple la función en la nucleación de microtúbulos y la formación del huso mitótico, si no que se ha descrito que también puede ser un sitio de secuestro y degradación de proteínas (Lacaille y cols., 2000). Esta localización centrosomal, aún no está claro si es o no dependiente de una inhibición del proteasoma, ya que existen reportes en que es necesario una rápida degradación de la proteína y su inhibición para una localización centrosomal (Antón y cols., 1999), mientras que otros trabajos muestran esta localización con proteínas metabólicamente estables y en ausencia de inhibidores del proteasoma (Lacaille y cols., 2000). Como sea, el centrosoma puede ser un importante sitio para la generación de epitopos virales. De este modo, puede que la señalización centrosomal observada, no corresponda a una señal de destinación específica de alguna proteína viral para el centro organizador de microtúbulos, sino más bien como consecuencia de los mecanismos propios del sistema inmune. Por otro lado, si fuera necesaria una inhibición del proteasoma, este podría ser

inhibido por un mecanismo propio del virus, con el cual este patógeno podría buscar una forma de evadir la respuesta inmune, dejando sin efecto la presentación antigénica mediada por MHC-I.

Finalmente, fue muy importante evaluar estos anticuerpos mediante ensayos de inmunofluorescencia indirecta en improntas de tejidos de peces sospechosos de presentar infección con el "ISAV-like". Ensayos iniciales realizados en el laboratorio mostraron la utilidad potencial de estos anticuerpos y por lo tanto, se decidió realizar una evaluación externa de los AcMos anti ISAV 2C2/C7, 3E8/B3 y 8F7/H10 realizada por ADL Diagnostic. Esta es la primera prueba de campo realizada y contó con 12 casos reales en un total de 134 muestras. Aquí, se mostró que los AcMos no tuvieron inmunoreactividad con improntas de peces sin ictericia y si lo hacían en las muestras con ictericia, aunque no en el 100% de los casos (tabla 6). Este dato no necesariamente indicaría una falla en el reconocimiento, ya que este síntoma no es exclusivo de la anemia infecciosa del salmón. Nuevos ensayos con mayor número de muestras, serían de gran relevancia para confirmar la eficiencia en el reconocimiento viral.

También es importante a futuro determinar si alguno de estos AcMos muestran reacción cruzada con otros aislados del ISAV, por ejemplo Europeos, con el fin de poder validar el uso de estos anticuerpos en el diagnóstico de peces con síndrome ictérico.

Al finalizar esta tesis, se ha avanzado un poco más en el entendimiento de las diferentes etapas del ciclo replicativo de los orthomyxovirus en general y del ISAV en particular, determinándose un posible paso de algunos componentes virales por el nucleolo, donde fue posible encontrar tanto proteínas como ARN antigenómico.

Del mismo modo, también se ha contribuido con el desarrollo de nuevas herramientas, como el panel de anticuerpos monoclonales contra el ISAV, que ayudarán a futuro aislar el "ISAV like", y con este generar una librería de cADN, que nos permitan analizar en detalle las diferencias y similitudes entre los distintos aislados virales presentes alrededor del mundo y así poder realizar nuevos estudios enfocados al diagnóstico, control y prevención de la enfermedad.

5 CONCLUSIONES.

Las conclusiones de este trabajo de tesis son las siguientes:

1. Se seleccionó un panel de anticuerpos específicos para el ISAV, el cual en ensayos de campo, muestra reacción cruzada con un virus caracterizado y conocido como "ISAV like".
2. Estos anticuerpos permitieron explorar las distintas fases del ciclo replicativo del aislado canadiense del ISAV. Además de las localizaciones citoplasmática y nuclear, se encontró que algunas de las proteínas virales se localizaron en el nucleolo.
3. Por medio de HIS se confirmó la localización de la hebra positiva del virus en el nucleolo, lo que sugiere que tanto proteínas virales como el genoma viral tienen una fase nucleolar.
4. Los AcMos también indican, que algunas proteínas virales se localizan en el Golgi y aparentemente en el centrosoma.
5. En un ensayo de campo con muestras de tejidos de peces con ictericia, se encontró inmunoreactividad con algunos AcMos, lo cual es importante como paso preliminar para el desarrollo de métodos de diagnóstico.

6 REFERENCIAS.

1. **Antón L.C.**, Schbert U., Bacik I., Princiotta M.F., Wearsch P.A., Gibbs J., Day P.M., Realini C., Rechsteiner M.C., Bennink J.R and Yewdell J.W. (1999). Intracellular localization of proteosomal degradation of a viral antigen. *J Cell Biol* 146: 113-124.
2. **Blake S.**, Bouchard D., Keleher W., Opitz M. and Nicholson B.L. (1999). Genomic relationships of the North American isolate of infectious salmon anemia virus (ISAV) to the Norwegian strain of ISAV. *Dis Aquat Org* 35: 139-144.
3. **Bouchard D.**, Keleher W, Opitz M., Blake S., Edwards C. and Nicholson B. (1999). Isolation of infectious salmon anemia virus (ISAV) from Atlantic salmon in New Brunswick, Canada. *Dis Aquat Org* 35(2): 131-137.
4. **Burzio L.O.**, Burzio V.A., Silva T., Burzio L.A. and Pardo J. (1997). Environmental bioadhesion: themes and applications. *Curr Opin Biotechnol* 8(3): 309-312.
5. **Cheng G.**, Brett M. E. and He B. (2002). Signals that dictate nuclear, nucleolar and cytoplasmic shuttling of the $\gamma_134.5$ protein of Herpes simplex virus type I. *J Virol* 76: 9434-9445.
6. **Clouthier S.C.**, Rector T, Brown N.E. and Anderson E.D. (2002). Genomic organization of infectious salmon anaemia virus. *J Gen Virol* 83: 421-428.
7. **Cunningham C.O.** and Snow M. (2000). Genetic analysis of infectious salmon anaemia virus (ISAV) from Scotland. *Dis Aquat Organ* 41(1):1-8
8. **Dannevig B.H.**, Falk K. and CMcL Press (1995a). Propagation of infectious salmon anaemia (ISA) virus in cell culture. *Vet Res* 26: 438-4442.
9. **Dannevig B.H.**, Falk K. and Namork E. (1995b). Isolation of the causal virus of infectious salmon anaemia (ISA) in a long-term cell line from Atlantic salmon head kidney. *J Gen Virol* 76: 1353-1359.
10. **Dannevig B.H.** and Thorud K.E. *Fish disease and Disorder, 1999*, Cap 4: Other viral diseases and agents of cold water fish: infectious salmon anaemia, pancreas disease and viral erythrocytic necrosis.
11. **Devold M.**, Krossoy B., Aspehaug V. and Nylund A. (2000). Use of RT-PCR for diagnosis of infectious salmon anaemia virus (ISAV) in carrier sea trout *Salmo trutta* after experimental infection. *Dis Aquat Org* 40: 9-18.

12. **Duensing S.**, Lee L.Y., Duensing A., Basile J., Piboonniyom S., González S., and Crum C.P. (2000). The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins cooperate to induce mitotic defects and genomic instability by uncoupling centrosome duplication from the cell division cycle. *PNAS* 97 (18): 10002-10007.
13. **Duensing S.** and Munger K. (2002). Human papillomavirus and centrosome duplication errors: modeling the origins of genomic instability. *Oncogene* 21 (40): 6241-6248.
14. **Emani M.** (1997). [Structure and function of influenza virus NS1 and NS2 protein]. *Nippon Rinsho* 55 (10): 2605-2609.
15. **Falk K.** and Dannevig B.H. (1995). Demonstration of infectious salmon anaemia (ISA) viral antigens in cell cultures and tissue sections. *Vet Res* 26: 499-504.
16. **Falk K.**, McL. Press, Landsverk T. and Dannevig B.H. (1995). Spleen and kidney of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) show histochemical changes early in the course of experimentally induced infectious salmon anaemia (ISA). *Vet. Immunol Immunopathol* 49: 115-126.
17. **Falk K.**, Namork E., Rimstad E., Mjaaland S. and Dannevig B.H. (1997). Characterization of infectious salmon anemia virus, an orthomyxo-like virus isolated from Atlantic salmon (*Salmo salar* L). *J Virol* 71: 9016-9023.
18. **Falk K.**, Namork E. and Dannevig B.H. (1998). Characterization and applications of a monoclonal antibody against infectious salmon anaemia virus. *Dis Aquat Org* 34: 77-85.
19. **Hiscox J.A.** (2002). The nucleolus - a gateway to viral infection?. *Arch Virol* 147: 1077-1089.
20. <http://us.expasy.org/prosite/>
21. **Jamett A.**, Aguayo J., Miquel A., Miller I., Arriegada R., Becker M.I., Valenzuela P. and Burzio L.O. (2001). Characteristics of monoclonal antibodies against *Piscirickettsia salmonis*. *J Fish Dis* 24: 205-215.
22. **Kibenge F.S.B.**, Lyaku J.R., Rainnie D. and Hammell K.L. (2000). Growth of infectious salmon anaemia virus in CHSE-214 cells and evidence for phenotypic differences between virus strains. *J Gen Virol* 81: 143-150.

23. **Kibenge F.S.B.**, Gárate O.N., Johnson G., R. Arriegada R., Kebenge M.J.T. and Wadowska D. (2001a). Isolation and identification of infectious salmon anaemia virus (ISAV) from Coho salmon in Chile. *Dis Aquat Org* 45: 9-18.
24. **Kibenge F.S.B.**, Kibenge M., Mackenna P., Stothard P., Marshall R., Cusack R. and McGeachy S. (2001b). Antigenic variation among isolates of infectious salmon anaemia virus correlates with genetic variation of the viral haemagglutinin gene. *J Gen Virol* 82: 2869-2879.
25. **Klump K**, Ruigrok R.W.H and Baudin F. (1997). Roles of the influenza virus polymerase and nucleoprotein in forming a functional RNP structure. *EMBO* 16: 1248-1257.
26. **Köhler G.** and Milstein C. (1975). Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256: 495-497.
27. **Krossoy B.**, Hordvik I., Nilsen F., Nylund A. and Endresen C. (1999). The putative polymerase sequence of infectious salmon anemia virus suggests a new genus within the orthomyxoviridae. *J Virol* 73: 2163-2144.
28. **Lacaille V.G.** and Andrlawicz M.J. (2000). Targeting of HIV-1 Nef to the centrosome: implications for antigen processing. *Traffic* 1: 884-891.
29. **Lannan C.N.**, Winton J.R and Fryer J.L.(1984). New cell lines. Fish cell lines: establishment and characterization of nine cell lines from salmonids. *In vitro* 20: 671-676.
30. **Lommer B** and Luo M. (2002). Structural plasticity in influenza virus protein NS2 (NEP). *J Biol Chem*; 277(9): 7108-7117
31. **Marchetti B.**, Ashrati G.H., Tsirimonaki E., O'Brien P.M. and Campo M.S. (2002). The bovine papillomavirus oncoprotein E5 retains MHC class I molecules in the Golgi apparatus and prevents their transport to the cell surface. *Oncogen* 21 (51): 7808-7816
32. **Melville K.J.** and Griffiths S.G. (1999). Absence of vertical transmission of infectious salmon anemia virus (ISAV) from individually infected Atlantic salmon *Salmo salar*. *Dis Aquat Org* 38: 231-234.
33. **Michienzi A.**, Cagnon L., Bahner I., and Rossi J. (2000). Ribozyme-mediated inhibition of HIV 1 suggests nucleolar trafficking of HIV-1 RNA. *PNAS* 97: 8955-8960.

34. **Mjaaland S.**, Rimstad E., Falk K. and Dannevig B.H. (1997). Genomic characterization of the virus causing infectious salmon anemia in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.): an orthomyxo-like virus in teleost. *J Virol* 71: 7681-7686.
35. **Murray A.**, Smith R. and Stagg R. (2002). Shipping and the spread of infectious salmon anemia in Scottish aquaculture. *Emerging Infectious Diseases* 8: 1-5.
36. **Petit C.**, Giron M.L., Tobaly-Tapiero J., Bittoun P., Real E., Jacob Y., Tordo N., and Said A. (2003). Targeting of incoming retroviral Gag to the centrosome involves a direct interaction with the dynein light chain 8. *J Cell Sci* 116: 3433-3442.
37. **Portela A.** and Digard P. (2002). The influenza virus nucleoprotein: a multifunctional RNA-binding protein pivotal to virus replication. *J Gen Virol* 83: 723-734.
38. **ProChile New York** (2003). Perfil de los productos del mar en los Estados Unidos.
39. **Pyper J.M.**, Clements J.E, and Zink M.C (1998). The nucleolus is the site of Borna Disease Virus RNA transcription and replication. *J Virol* 72: 7697-7702.
40. **Quick-type™** user's manual. Life codes corporation.
41. **Rimstad E.**, Mjaaland S., Snow M., Mikalsen A.B. and Cunningham C.O. (2001). Characterization of the infectious salmon anemia virus genomic segment that encodes the putative hemagglutinin. *J Virol* 75: 5352-5356.
42. **Ritchie R.J.**, Cook M., Melville K, Simard N., Cusak R. and Griffith S. (2001). Identification of infectious salmon anaemia virus in Atlantic salmon from Nova Scotia (Canada): evidence for functional strain differences. *Dis Aquat Org* 44:171-178.
43. **Sambrook J.**, Fritsch E.F. and Maniatis T. (1989). *Molecular cloning: A laboratory Manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbour, NY, Cold Spring Harbour Laboratory Press.
44. **Sarafino A.**, Valli M.B., Andreola F., Crema A., Ravagnan G., Bertolini L. and Carloni G. (2003). Suggested role of the Golgi apparatus and endoplasmic reticulum for crucial sites of hepatitis C virus replication in human lymphoblastoid cells infected *in vitro*. *J Med Virol* 70 (1): 34-41.
45. **Snadvik T.**, Rimstad E. and Mjaaland S. (2000). The viral RNA 3'-end 5'- end structure and mRNA transcription of infectious salmon anaemia virus resemble of influenza viruses. *Arch Virol* 145: 1659-1669.

46. **Snow M.** and Cunningham C.O. (2001). Characterization of the putative nucleoprotein gene of infectious salmon anaemia virus (ISAV). *Virus Res* 74: 111-118.
47. **Spiropoulou C.F.**, Goldmith C.S., Shoemaker T.R., Peter C.J. and Compans R.W. (2003). Sin nombre virus glycoprotein trafficking. *Virology* 30: 48-63.
48. **Steinhauer D.** (1999). Role of hemagglutinin cleavage for the pathogenicity of influenza virus. *Virology* 258: 1-20.
49. **Thorud K.** and Djupvik H.O. (1988). Infectious anaemia in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Bull Eur Assoc Fish Pathol* 8: 109-111.
50. **Villegas J.**, Araya P., Bustos-Obregon E. and Burzio L.O. (2002). Localization of the 16S mitochondrial rRNA in the nucleus of mammalian spermatogenic cells. *Mol Hum Rep* 8: 977-983.
51. **Wergeland H.I.** and Jakobsen R.A. (2001). A salmonid cell line (TO) for production of infectious salmon anaemia virus (ISAV). *Dis Aquat Org* 44: 183-190.
52. **Wray W.**, Boulikas T., Wray V.P. and Hancock R. (1981). Silver staining of proteins in polyacrylamide gel. *Anal. Biochem.* 118(1): 197-203
53. **Wurm T.**, Chen H., Hodgson T., Britton P., Brooks G. and Hiscox J.A. (2001). Localization to the nucleolus is a common feature of coronavirus nucleoprotein and the protein may disrupt host cell division. *J Virol* 75: 9345-9356
54. www.salmochile.cl/sch/
55. www.micro.msb.le.ac.uk/335/Orthomyxoviruses.html