



FONDO DE INVESTIGACION PESQUERA

INFORMES TECNICOS FIP

FIP - IT / 95 - 34

INFORME : ESTUDIO INMUNOLOGICO DE
FINAL : *Piscirickettsia salmonis*

UNIDAD : UNIVERSIDAD CATOLICA DE VALPARAISO
EJECUTORA

INFORME FINAL

PROYECTO FIP 95 - 34

“ESTUDIO INMUNOLOGICO DE *Piscirickettsia salmonis*”

Dr Sergio Marshall G

Consultor

Universidad Católica de Valparaíso

RESUMEN EJECUTIVO

PROYECTO FIP 95 - 34

“Estudio Inmunológico de *Piscirickettsia salmonis*”

I. RESUMEN EJECUTIVO

El propósito fundamental de este proyecto era entregar, en el plazo de un año, el máximo de antecedentes sobre las potenciales variedades de *Piscirickettsia salmonis* que merman las tres especies mayoritarias de salmónidos cultivadas en Chile : *Oncorhynchus mykiss*, *Oncorhynchus kisutch* y *Salmo salar*. Este debía lograrse realizando un exhaustivo análisis experimental obtenido de muestras de campo de individuos afectados por la enfermedad, para conocer, en lo posible y con un grado de detalle confiable, el potencial inmunológico del agente para así poder diseñar estrategias de profilaxis para controlar, e idealmente erradicar el agente patógeno en la industria salmoniculora nacional. Hemos cumplido con el propósito y además estamos en condiciones de sacar conclusiones interesantes no solo para el sector productivo involucrado, sino también para la investigación básica sobre el agente.

Realizamos un completo y actualizado análisis de la información publicada tanto a nivel nacional como internacional sobre el tema, etapa que nos permitió hacer una adecuada descripción de la patología de la enfermedad y de su agente causal. Luego nos concentramos en la masiva obtención y análisis de muestras de órganos y de sangre de especímenes tanto enfermos como aparentemente sanos provenientes de seis diferentes centros de cultivo de la X Región del país. Con ellos hicimos un catastro de la presencia cuali y cuantitativa del agente en las tres especies de salmónidos de interés, determinando la calidad y estabilidad estructural del agente y evaluando el potencial inmunogénico de sus componentes analizado frente a inmunoglobulinas de los propios peces infectados y normales, y frente a las inmunoglobulinas de conejos y ratones previamente expuestos al a diferentes aislados naturales del agente. En total, se obtuvieron muestras de 450 individuos, de los cuales 250 pudieron ser analizados en forma confiable y reproducible, universo en el cual basamos nuestras conclusiones, que aunque de carácter general, son hasta ahora inéditas.

Por tratarse de un parásito intracelular obligado presente en las células de los tejidos afectados en forma de vacuolas o vesículas intracitoplasmáticas, debimos generar un método de purificación del agente causal, lo más libre posible de contaminantes celulares. Lo logramos, *lo que constituye la primera contribución del proyecto*, que preparamos para su publicación. El método se fundamenta en procedimientos estándares de fraccionamiento subcelular de tejidos infectados, asociado a la aplicación de fuerzas iónicas diferenciales durante el procesamiento de los extractos enriquecidos con el patógeno, para luego purificarlo mediante ultracentrifugación en gradientes de matrices que resuelven en base a densidad y osmolaridad. Nuestra primera observación es que, independiente de la especie, los tres órganos que usamos de referencia, hígado bazo y riñón, presentan un grado equivalente de invasión por el agente, lo que nos hace sospechar que ella puede ser esencialmente sistémica, sin preferencia clara de un órgano, lo que tiene interesantes implicancias sobre la necesidad de verificar si es que verdaderamente existen, o se requieren, receptores específicos para la infección "in vivo". Este punto es crucial para entender la biología del agente, hasta hoy, casi completamente desconocida. La segunda observación relevante, impactante y desconcertante, es que en individuos con un estado patológico avanzado de la enfermedad, existe una abundante presencia tanto del agente como de su DNA en el suero. Esta información absolutamente inédita, nos ha permitido diseñar un método potencial de catastro masivo de la enfermedad basado en la técnica de la PCR, con la ventaja de que no requiere sacrificar ni estresar al individuo para hacer el análisis, dado que sólo se requiere una mínima muestra de su sangre (100 microlitros) para realizarlo. Evaluaremos *post proyecto* la factibilidad de hacer el análisis directamente desde escamas y branquias. *Esta es la segunda, y más importante contribución derivada del proyecto.*

El análisis de los componentes estructurales del agente purificado, desde el punto de vista de su potencial inmunogénico, indica que ninguno de sus polipéptidos se destaca en forma singular, a excepción de uno de ellos con un peso molecular aproximado de 50.000 daltons y que, aparentemente, estaría asociado al componente lipopolisacárido

del agente. Independiente de ello, el perfil polipeptídico de todos los aislados es muy similar, *intra e inter* especies, lo que indicaría que no hay diferencias significativas, por lo menos desde el punto de vista estructural, entre los aislados de las diferentes especies salmonídeas analizadas. De ser así, existiría la posibilidad de generar una estrategia común para las tres especies al pensar en una potencial vacuna protectora. Sin embargo debemos dejar claro que esta generalización la hacemos con mucha cautela dado que la evidencia que nosotros hemos podido recolectar del impacto del patógeno en *salar*, no es equivalente al detectado en *coho* y *trucha*, respectivamente. Por otra parte, el análisis de modificaciones postraduccionales de los componentes polipéptidicos del agente indica que no hay glicoproteínas, las que esencialmente cumplen, entre otros, el rol de actuar como potenciales receptores celulares. La excepción la constituye el lipopolisacárido (LPS) de la bacteria, que como era de esperar, responde a las sondas utilizadas para reconocer sus componentes de carbohidratos. De allí que concluyamos que ninguno de los polipéptidos estructurales del agente obtenido de las muestras "in vivo" presenta una potencialidad inmunogénica humoral comparable a la del LPS bacteriano, el que se transforma, por ende, en el mejor inmunógeno y sobre el cual proponemos las estrategias de vacunación con las sondas polisomales. *Esta es la tercera contribución al proyecto.* Que el LPS sea un buen inmunógeno es un antecedente muy importante desde el punto de vista epidemiológico, dado que este componente es, para la mayoría de los microorganismos, especie específico, lo que ratifica nuestro pensamiento de que podríamos diseñar una estrategia común para la protección de las tres especies susceptibles, utilizando una fracción enriquecida en el LPS como inductor de la respuesta humoral. En consecuencia, esta fue nuestra fuente de material para el diseño y construcción de liposomas como inductores potenciales de una respuesta protectora sostenida a aplicar "in vivo".

El análisis de la respuesta humoral frente al agente purificado de peces naturalmente infectados comparada con la que se obtiene frente a antisueros generados en conejos y para el microorganismo cultivado "in vitro", es definitivamente diferente. Tal como lo

habíamos postulado para un parásito intracelular, el agente "in vivo" no parece ser un muy buen inductor de respuesta inmune humoral, CON LA EXCEPCION del LPS, lo que nuevamente ratifica la conveniencia de su uso como herramienta inductiva de una protección inmunológica "in vivo". Como resultado de esta importante observación, hemos estructurado una técnica rápida, reproducible y eficiente para enriquecer el LPS bacteriano desde extractos de órganos infectados, lo que constituye *la cuarta contribución significativa del desarrollo del proyecto.*

Adicionalmente, logramos generar, por primera vez, anticuerpos policlonales monoespecíficos en tumores ascíticos de ratón no solo contra la cepa tipo de *P. salmonis* sino también contra aislados naturales de coho y de trucha. *Esta batería de anticuerpos constituye la quinta contribución del proyecto*, dado que nos permitirá seguir evaluando la potencialidad inmunológica de aislados productos de brotes, que junto al stock de antisueros policlonales de conejos contra el agente cultivado "in vitro" que disponemos, nos permitirá definir algún potencial cambio antigénico que se genere entre las poblaciones del patógeno asociado a los peces en cultivo. Ponemos esta información y los componentes a disposición de la Subsecretaría de Pesca para su uso referencial.

Para permitir el análisis cuantitativo de la respuesta inmune potencial inducida "in vivo" por el agente, la sangre obtenida fue procesada y del suero obtenido se hizo una purificación para obtener una fracción enriquecida en inmunoglobulinas naturales (esencialmente IgMs). Con ellas, debidamente cuantificadas, se realizó el análisis comparativo de la capacidad de inducción del agente "in vivo", comparada con la respuesta inducida en conejos y en ratones, usando los anticuerpos descritos en el párrafo anterior. Se utilizaron 100 sueros seleccionados, los que confirmaron que, especialmente para *coho* y *trucha*, el único inmunógeno detectable en forma categórica es el LPS bacteriano.

Concluimos así un proyecto exitoso, el que nos ha permitido a acceder a nuevos fondos estatales para continuar con el estudio del agente, materializado en el Proyecto FONDEF 1038, que en un plazo de tres años nos permitirá generar una vacuna por DNA recombinante contra el agente, y así contribuir a la potencial erradicación del agente de la industria salmoniculora nacional.

INDICE GENERAL

| | Página |
|--|-----------------|
| RESUMEN EJECUTIVO | i - v |
| INDICE GENERAL | v i- vii |
| OBJETIVOS | 1 |
| Objetivo General | |
| Objetivos Específicos | |
| ANTECEDENTES | 2 |
| METODOLOGIA DE TRABAJO | |
| 1. Obtención de las muestras | 4 |
| 2. Procesamiento de las muestras | 5 |
| 3. Observación microscópica de <i>P. salmonis</i> | 6 |
| 4. Identificación de <i>P. salmonis</i> por IFAT | 6 |
| 5. Caracterización y purificación de antígenos | 6 |
| 5.1. Extracción diferencial de componentes hidrofóbicos | 6 |
| 5.2. Análisis proteico en geles de poliacrilamida conteniendo SDS (SDS-PAGE) | 7 |
| 5.3. Detección del componente lipopolisacárido (LPS) | 8 |
| 5.4. Detección de polipéptidos y LPS por Western-Blot | 8 |
| 5.5. Revelado de Inmunoblots con Peroxidasa de Rábano (HRP) | 8 |
| 5.6. Detección de glicoproteínas en geles por Concanavalina A marcada a Isotiocianato de Fluoresceína (ConA-FITC) | 9 |
| 5.7. Inmunoprecipitación de proteínas del patógeno desde extractos crudos. | 10 |
| 6. Purificación de Inmunoglobulinas Séricas de Sangre | 10 |
| 6.1. Remoción de Sulfato de Amonio por Columnas de Exclusión | 10 |
| 7. Obtención de anticuerpos policlonales monoespecíficos | 11 |
| 8. Desarrollo e implementación de una Metodología para aplicar la Técnica de PCR (polymerase Chain Reaction) a muestras mínimas de Tejidos y Sueros. | 12 |

| | |
|---|-------|
| 8.1. Tratamiento con Lisozima para Abrir las Bacterias | 12 |
| 8.2. Lisis Total por Detergente (SDS) y Degradación Proteica (Proteinasa K) | 12 |
| 8.3. Extracción con P:C:I para la obtención de DNA | 13 |
| 8.4. Precipitación de DNA con alcohol | 13 |
| 8.5. Diseño de Iniciadores para PCR | 13 |
| 8.6. Amplificación por PCR | 13 |
| 9. Construcción de sondas liposomales | 14 |
| 9.1. Preparación de las muestras | 14 |
| 9.2. Obtención de los liposomas | 14 |
| 10. Evaluación de los liposomas | 15 |
| 10.1. Microscopía de luz | 15 |
| 10.2. Análisis por dot-blot | 15 |
| RESULTADOS | |
| 1. Obtención de las muestras | 17 |
| 2. Purificación y caracterización de antígenos | 17 |
| 3. Purificación de anticuerpos anti- Piscirickettsia | 22 |
| 4. Análisis comparativo de las proteínas obtenidas | 22 |
| 5. Generación de anticuerpos policlonales monoespecíficos | 23 |
| 6. Detección de P salmonis en sueros por la técnica de PCR | 23 |
| 7. Construcción de sondas liposomales | 24 |
| ANALISIS Y DISCUSION DE RESULTADOS | 26 |
| CONCLUSIONES | 39 |
| REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS | 40 |
| ANEXOS | |
| Anexo 1.Descripción de la patología | 1-16 |
| Anexo 2.Tablas | 1-6 |
| Anexo 3. Figuras | 1- 24 |
| Anexo 4.Diseño de estrategias para la vacunación de peces | 1- 4 |

OBJETIVOS.

OBJETIVO GENERAL :

“Realizar un catastro de las variedades de *Piscirickettsia salmonis* que atacan a las diferentes especies de salmónidos cultivados en Chile, revisar la información existente a nivel nacional e internacional y evaluar alternativas de profilaxis y de preparados antigénicos que contribuyan a la inducción sostenida de una resistencia a la infección y/o expresión del patógeno”

OBJETIVOS ESPECIFICOS:

PRIMER OBJETIVO ESPECIFICO :

“Describir la patología y su agente causal”

SEGUNDO OBJETIVO ESPECIFICO:

“Evaluar la capacidad inmunológica de *P. salmonis*”

TERCER OBJETIVO ESPECIFICO:

“Diseñar estrategias para la aplicación de posibles vacunas”

Para la consecución del primer objetivo específico, hemos revisado la bibliografía nacional e internacional. En el Primer informe de Avance se presentó un escrito que contenía una revisión y análisis de la información existente, en este informe se presenta el mismo escrito actualizado a la fecha (ANEXO 1). Para el cumplimiento del segundo y tercer objetivo específico se ha desarrollado la metodología de trabajo de la propuesta técnica.

ANTECEDENTES

Piscirickettsiosis (PRD), Septicemia Rickettsial Salmonidea (SRS), Síndrome del Salmon coho (CSS) y Enfermedad de Huito son diferentes denominaciones que se han utilizado para definir una infección sistémica causada por un organismo tipo rickettsial que afecta preferentemente a los cultivos de salmónidos en el sur de Chile, una vez que son traspasados al agua de mar. El agente causal de esta enfermedad epizoótica fue detectado por primera vez en forma epidémica en 1989 (Bravo y Campos, 1989), fecha desde la cual ha causado importantes mortalidades en los cultivos en fase de engorde. Las especies más afectadas son salmon coho (*Oncorhynchus kisutch*), trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*), y salmon del Atlántico (*Salmo salar*), en orden de susceptibilidad, aunque también afecta a otras especies salmonídeas de menor impacto comercial Fryer y Lannan, 1996).

En un corto período esta condición ha tenido un efecto dramático en la acuicultura chilena. En abril de 1989, cuatro pisciculturas se vieron afectadas por el SRS y un año más tarde, aumentaban a 32 las granjas afectadas. Las mortalidades mensuales oscilan entre 1 a 20%, pero pueden alcanzar el 40%. El promedio de pérdidas acumulativas es de 60% pero en algunos sitios puede exceder el 90%. Las pérdidas económicas en 1995 atribuidas a esta patología ascienden a veinte millones de dólares en este sector productivo.

Posteriormente a su descripción en Chile, patologías similares han sido observadas en otras regiones geográficas tales como Noruega (Olsen et al., 1993), Irlanda (Rodger y Drinan, 1993), Canadá (Evelyn, 1992) y Taiwan (Chern y Chao, 1994). Aunque las lesiones y sintomatología observadas son similares a las encontradas en Chile, los porcentajes de mortalidad son mucho más bajos. Aparentemente, existirían ciertas condiciones ambientales que favorecerían la patogenicidad del microorganismo en los cultivos del sur de Chile. Actualmente se acepta sin discusión que la enfermedad

es causada por un patógeno intracelular obligado de reciente clasificación y denominado como *Piscirickettsia salmonis* gen. nov. sp. nov. (Fryer et al, 1992).

La quimioterapia no ha sido un medio efectivo para controlar la enfermedad, y los ensayos de vacunación experimentales con bacterinas aplicados en Chile han dado resultados negativos en la prevención de la patología (Smith y col, 1996).

A pesar del corto tiempo de aparición de la enfermedad, existe bastante bibliografía al respecto. Sin embargo, la mayoría de las investigaciones reportadas en la literatura se han centrado en la descripción de la patología y en el desarrollo de técnicas básicas de diagnóstico; existiendo muy poca información referente a la caracterización del agente causal y/o de los mecanismos de virulencia que este utiliza para desencadenar la enfermedad. Tampoco se ha profundizado en la respuesta del hospedador frente al patógeno, situación que probablemente se deba a la dificultad que involucra el crecer el microorganismo, que es un parásito intracelular, solamente en células de peces cultivadas "in vitro", situación que limita no solo la cantidad que de él se obtiene, sino también la estimación del potencial infectivo que cada aislado pueda presentar "in vivo".

METODOLOGIA DE TRABAJO.

1. Obtención de las muestras

Las muestras de tejido se obtuvieron de hígado, riñón y bazo de cada pez a estudiar. Estos órganos se colocaron en forma conjunta en buffer HN (Hepes 20 mM, NaCl 500mM, NaEDTA 5mM, PMSF 1mM, pH 7,5) más glicerol al 10 %, se utilizó este tampón de alta fuerza ionica con el objetivo de mantener las bacterias en un medio similar al agua de mar y así mantener la integridad estructural del agente aislado a partir de organismos provenientes de jaulas. Las muestras fueron congeladas para ser enviadas desde los Centros de Cultivo en la X Región, al laboratorio base en la Universidad Católica de Valparaíso.

De cada pez, se obtuvieron paralelamente muestras de sangre por punción de la vena caudal, de un volumen de 4 ml de sangre total por cada uno. Durante el desarrollo del proyecto se intentaron tres alternativas para la obtención de sueros:

1. Enviar la sangre heparinizada para ser procesada en Valparaíso
2. Enviar la sangre con EDTA para ser procesada en Valparaíso
3. Guardar la sangre con EDTA o heparina pero procesarla en Puerto Montt
4. Enviar la sangre total sin anticoagulante.

Debido a los inconvenientes del traslado (alta temperatura, movimiento y tiempo) la alternativa más adecuada fue guardar la sangre inmediatamente después de extraída en tubos con EDTA y procesarla para la obtención de sueros lo antes posible en Puerto Montt, evitando mandar la sangre completa, ya que este procedimiento produjo lisis de los eritrocitos, haciendo las muestras inutilizables. Los sueros fueron colocados en alícuotas en tubos estériles y guardados también a -20 °C, hasta ser enviados a nuestro Laboratorio.

2. Procesamiento de las muestras

La purificación de *Piscirickettsia salmonis* se realizó en principio de acuerdo al protocolo propuesto por Marshall (1994), con algunas modificaciones posteriores para su optimización. La purificación de las bacterias se basa fundamentalmente en la centrifugación diferencial de fracciones subcelulares de extractos de tejido sometidas a gradientes continuas y discontinuas de diferentes polímeros (ficol, sacarosa y rinografina), las que permiten resolver ya sea por densidad u osmolaridad.

Los procedimientos ensayados para la purificación del agente a partir de órganos infectados fueron los siguientes:

Los órganos son lavados profusamente con tampón HN suplementado con Triton X-100 al 1%, los órganos son pesados y luego homogenizados en un Omni-mixer en una relación de 5 veces el volumen de buffer por gramo de peso húmedo de muestra. El homogenado se filtra y se centrifuga a 3500 xg durante 30 min a 4°C. El pellet que contiene las rickettsias se lava en buffer HN (3500 xg durante 30 min a 4°C) para eliminar el detergente y se homogeniza en forma manual para depositarlo sobre un colchón de sacarosa al 15 % en buffer HN a 3200 xg, 30 min a 4°C. El pellet obtenido se resuspende en buffer HN y se centrifuga nuevamente sobre un colchón de sacarosa, ahora a 50% en buffer HN, y se centrifuga a 3200 xg, 30 min, 4°C.

Las rickettsias se recuperan concentradas en la interfase, la que se colecta y diluye con buffer HN, y se centrifuga a 5000xg por 30 min a 4°C. El pellet es resuspendido en buffer HN y se deposita en una gradiente de densidad discontinua (4, 21, 28% de Ficoll; Sacarosa 50%-Ficoll 10% o Renografina 14, 21 y 28% en tampón HN) (Le Gall y col, 1991) y centrifugadas a equilibrio a 300000 xg por 30 min a 4°C.

La interfase que contiene las rickettsias se recupera y se diluye con a lo menos 5 volúmenes de HN y se centrifuga a 50000 xg por 30 min a 4°C. El pellet se resuspende

en buffer PBS y se analiza mediante microscopía óptica para determinar el grado de pureza de los microorganismos en la fracción enriquecida y se determina su concentración proteica según el método de Bradford (1989).

3. Observación microscópica de *Piscirickettsia salmonis*

De cada fracción obtenida durante el procesamiento descrito en el punto 2, se hizo en forma paralela tinciones Gram y Giemsa (Manual of Methods for General Bacteriology, 1990) para la observación comparativa del enriquecimiento de bacterias en los distintos pasos de la purificación. Estas observaciones se complementaron con la tinción de Naranja de Acridina (Lannan & Fryer, 1991).

4. Identificación de *Piscirickettsia salmonis* por inmunofluorescencia indirecta

Para la observación más específica de las bacterias se realizó la tinción de inmunofluorescencia (IFAT) con una dilución de 1/1000 en PBS 0.01 M del anticuerpo anti-piscirickettsia obtenido de conejo (Lannan et al., 1991). También se realizó un ensayo de inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo monoclonal de ratón dirigido contra una bacteria tipo rickettsia aislada de Ostión

5. Caracterización y purificación de antígenos

5.1 Extracción diferencial de componentes hidrofóbicos

Basados en el trabajo de Sanchez-Ferrer y colaboradores (1994) hemos adaptado el siguiente procedimiento para nuestro agente de interés.

Los órganos son lavados profusamente con tampón HN, los órganos son pesados y luego homogenizados en un Omni-mixer en una relación de 5 veces el volumen de

buffer por gramo de peso húmedo de muestra. El homogenado se filtra y se centrifuga a 3500 xg durante 30 min a 4°C. El pellet que contiene las rickettsias se homogeniza en forma manual y una fracción (P1) (1mg proteína/ml muestra) se combina con 2% Triton X-114 en la proporción 5:1 (detergente : proteína) y se incuba a 0°C hasta observar turbidez o precipitado blanco. Se centrifuga a 58000 xg por 20 min a 0°C. El pellet resultante P2 se descarta, ya que es la fracción de detergente insoluble rica en fosfolípidos. El sobrenadante S2 se coloca sobre un colchón de 0.25 M sacarosa con 0.5 % Triton X-114. Se incuba 10 min a 30 °C y posteriormente se centrifuga 5 min a 2500 xg (6000 rpm ultracentrífuga Beckman) a 30 °C.

Se obtuvieron tres fases. a) una fase superior S3 , sobrenadante rico en proteínas solubles, b) fase intermedia, de sacarosa c) una fase inferior P3, rica en detergente y proteínas integrales. Las fases P3 y S3 se dializan en PBS 0.01 M y luego se determina el contenido proteico de cada fracción según el método de Bradford (1989).

5.2 Análisis proteico en geles de poliacrilamida SDS-PAGE (Laemmli, 1970)

A las interfases obtenidas de la purificación (Punto 2) se les examinó su perfil proteico en SDS-PAGE (tamaño normal y minigeles), luego de cuantificar el contenido proteico según Bradford. Se usó como control positivo una cepa de piscirickettsia conocida, la EM-90, donación generosa del Sr. Enrique Madrid, Marine Harvest, Puerto Montt. El procedimiento se aplicó a las fracciones obtenidas antes y después del tratamiento con Triton X-114 para fines comparativos.

Los geles fueron teñidos indistintamente con Azul de Coomassie o bien con la Tinción con nitrato de plata para visualizar proteínas (Blum y col, 1987).

5.3 Detección del componente lipopolisacárido (LPS)

Para la extracción de los LPS se siguió básicamente la metodología descrita por Hitchcock y Brown (1983). Las muestras tratadas con Triton X-100 resuspendidas en tampón de muestra se calentaron en un baño a 100°C durante 10 min. Posteriormente se incubaron con una solución de Proteinasa K (2,5 mg/ml) preparada en tampón de muestra durante 1 h a 60°C.

Las muestras de LPS se analizaron en geles de poliacrilamida-SDS como se describió en el punto 5.2 para proteínas y posteriormente se visualizaron utilizando la tinción de plata para LPS descrita por Tsai y Frasch (1982). Como patrones se usaron LPS liofilizados de *Escherichia coli* y *Salmonella minesota* R5 (Sigma).

El componente estructural específico de la región "core" del LPS, KDO (2 ceto-3-deoxioctonato) se determinó cualitativamente siguiendo la técnica descrita por Waravdekar y Saslaw (1959).

5.4 Detección de polipéptidos y LPS del patógeno por Western-Blot

Una vez separados en geles de poliacrilamida-SDS, los polipéptidos y lipopolisacáridos fueron transferidos a membranas de nylon (0.22 um) mediante exposición a un campo eléctrico a 200 mA durante 30 min en tampón de transferencia, para inmediatamente después realizar la detección inmunológica de doble sandwich utilizando suero anti-*Yersinia enterocolitica* de conejo como primer anticuerpo y el conjugado anti-IgG de conejo-HRP como segundo, para revelar la reacción colorimétrica potencial con el sustrato para la enzima HRP (peroxidasa de rábano) según las indicaciones del fabricante.

5.5. Revelado de Inmunoblots con Peroxidasa de Rábano.

La membrana se lava con buffer PBS en presencia de 0.05 % de Tween 20, seguido de dos lavados de 15 minutos cada uno en buffer PBS sin detergente. Mientras tanto, se prepara la solución de revelado fresca que consiste en 60 mg de Diaminobenzidina disuelta en 20 ml de Metanol absoluto frío, que una vez en solución se afora a 100 ml con PBS. Inmediatamente antes de sumergir la membrana, se agregan 60 microlitros de una solución fría al 30% de H₂O₂, la que actúa catalizando la reacción. La reacción se detiene removiendo la membrana de la solución de revelado y lavando profusamente con agua desionizada.

5.6. Detección de glicoproteínas en geles por Concanavalina A marcada con Isotiocianato de Fluoresceína (ConA-FITC).

Un gel Laemmli-SDS de 10% sometido a electroforesis hasta que el marcador de movilidad (Azul de Bromofenol) alcance el borde inferior del gel, es fijado en una solución 50% Metanol durante 30 minutos. Luego el gel es sumergido en 500 ml de buffer de estabilización (0.05 M Tris, 0.1 M NaCl, 1.0 mM CaCl₂. Una vez ajustado a pH 7.0, se agrega MnCl₂ a una concentración final de 1.0 mM) durante 6 horas. Una vez transcurrido este tiempo el gel es transferido a una solución fresca del mismo buffer conteniendo la lectina Concanavalina A marcada con Isotiocianato de fluoresceína a una concentración final de 1.0 mg/ml, e incubado durante 4 horas con agitación suave. El gel es lavado en el buffer de estabilización (4 veces de 15 minutos cada uno), y luego observado en un transiluminador a 250 nanómetros. La fluorescencia solo deberá asociarse a moléculas que contengan radicales carbohidratados reconocidos por la lectina. Para optimizar la resolución de la fluorescencia, se sumerge el gel en 50% Metanol, y se observa al transiluminador después de 15 minutos de agitación suave. Para incrementar aún más la señal, el gel en 50% Metanol es transferido a un contenedor con una solución 100% Metanol, y luego de 15 minutos se observa nuevamente al transiluminador.

5.7. Inmunoprecipitación de proteínas del patógeno desde extractos crudos.

Tomando una concentración estándar de extracto crudo (1.0 mg/ml), en un volumen de 0.5 ml, en presencia de los inhibidores de proteasa fenilmetilsulfonilflururo, aprotinina, leupeptina y pepstatina, a una concentración final de 1.0 mM, y 1.0 ug/ml para las tres últimas, en buffer C (50 mM Tris.HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.5 % Nonidet P-40, 0.5 % Deoxicolato de Sodio, y 0.1 % SDS) y en presencia de 1 ug/ml de BSA como transportador A la mezcla se agregan 1ug de anticuerpo policlonal en conejo anti-Piscirickettsia salmonis. Se incuba con rotación a 4°C por 1 hora y se le agregan 100 ul de una solución de Proteína A (0.1 mg/ml) y se incuba con rotación a 4°C por 1 hora. posteriormente se centrifuga a 10,000xg por 30 segundos y se lava el pellet 4 veces con buffer C. El pellet se resuspende en buffer Laemmli, para resolver las proteínas inmunoprecipitadas por geles PAGE-SDS.

6. Purificación de Inmunoglobulinas Séricas de Sangre.

El método utilizado y estandarizado en nuestro laboratorio fue el siguiente: La sangre recolectada (1-5 ml por pez) en tubos ad hoc conteniendo 0.13 M EDTA como anticoagulante, fueron mantenidos en hielo hasta llegar a un centro de procesamiento donde fueron centrifugados a 2,000xg por 10 minutos para separar el componente celular del suero. Este último, fue expuesto con agitación constante a una solución sobresaturada de Sulfato de Amonio, la que fue agregada gota a gota en frío, de acuerdo a la siguiente relación: 0,66 ml de solución saturada por ml de suero. Después de 1 hora en hielo, se centrifuga a 10,000xg para recuperar el pellet de proteínas, el que se resuspende en 0.5 x el volumen inicial en buffer PBS (pH 7.0).

6.1. Remoción del Sulfato de Amonio por Columnas de Exclusión.

El pellet conteniendo la fracción Inmunoglobulínica se somete a desalinización mediante columnas preformadas de Sephadex G-50. Estas se preforman de la siguiente

manera: 10 grs de Sephadex G-50 se hidratan toda la noche en 100 ml de 50 mM Tris (pH 7.5). Como columnas se utilizan puntas de pipetas desechables de 10 ml en una relación de volumen de columna : volumen de muestra = 10 : 1, lo que significa que cada columna es preparada individualmente para cada muestra. Las columnas empaquetadas se mantienen húmedas con parafilm en la punta, el que es removido al momento de usarlas sometiéndolas a centrifugación a 1,000xg por 1 minuto, e inmediatamente la muestra es depositada sobre la columna, repitiendo la centrifugación por un período de 2 minutos. La sal queda retenida en la columna y la fracción inmunoglobulínica se recupera, se cuantifica en su contenido proteico por el método de Bradford y se congela a -70° C hasta su uso. Alternativamente, y con 15 de las 100 muestras de suero procesadas, se hizo en paralelo el proceso de desalinización utilizando los "Microcentrifuge Filters" de corte de Peso Molecular 30,000 de Sigma Laboratories (USA), usando las especificaciones descritas por dicha compañía.

7. Obtención de anticuerpos policlonales monoespecíficos

La generación de anticuerpos policlonales monoespecíficos se realizó mediante la inmunización de ratones cepa CF-1 de 30 gr de peso, siguiendo básicamente la metodología descrita por Cevenini y colaboradores (1991). Como antígenos se emplearon los extractos purificados de *P. salmonis*, obtenidos a partir de órganos de peces con diagnóstico de Piscirickettsiosis. También se inmunizaron ratones con una preparación antigénica del aislado de *P. salmonis* EM-90 obtenida a partir de un cultivo celular.

Las muestras resuspendidas en PBS con formaldehído al 0,2% se emulsionaron con Adyuvante completo de Freund y se inyectaron intraperitonealmente los días 0, 7, 14 y 21. El día 6 los ratones fueron tratados con Pristan para inducir la formación de tumores ascíticos. El protocolo de inmunización está claramente explicitado en la Tabla 2. El líquido ascítico fue colectado por paracentesis peritoneal. El líquido que contenía los anticuerpos fueron desalinizados y mantenidos a -20°C hasta su uso.

Las soluciones de anticuerpo fueron probadas con los antígenos homólogos y heterólogos mediante la técnica de Dot-Blot, además se analizaron en geles de poliacrilamida -SDS y mediante Western Blot utilizando como anticuerpo anti IgG de ratón (molécula completa).

8. Desarrollo e implementación de una metodología para aplicar la técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) a muestras mínimas de tejidos o sueros.

Este método desarrollado por Sergio Marshall y colaboradores y consiste en lo siguiente: El protocolo está diseñado para realizarlo en tubos Eppendorf de 1.5 ml, y con no más de 15 mg de tejido o pellet seco ó 100 microlitros de suero.

Composición del buffer de extracción de DNA: 50 mM Tris pH 9.0, 0.75 M Sacarosa, 400 mM NaCl, 20 mM EDTA.

En forma separada se tiene :

Solución fresca de Lisozima 5 mg/ml - Solución de 10% SDS - Proteinasa K a 50 mg/ml - Fenol:Cloroformo:Alcohol isoamílico= 25:24:1 (P:C:I) - 3 M Na Acetato pH 5.4 - 100 % Etanol - 70% Etanol preparado fresco con agua desionizada.

8.1. Tratamiento con lisozima para abrir las bacterias.

Agregar lisozima a cada muestra a una concentración final de 0.5 mg/ml e incubar a 37°C por 45 minutos, con agitación violenta cada 15 minutos.

8.2. Lisis total por detergente (SDS) y degradación proteica (Proteinasa K).

Se agrega SDS a una concentración final de 0.1 % y se agita vigorosamente para su distribución uniforme en la muestra. Se agrega inmediatamente Proteinasa K a una concentración final de 0.5 mg/ml, se distribuye uniformemente en la muestra problema con agitación y se incuba a 58°C por 1 hora con agitación cada 15 minutos.

8.3. Extracción con P:C:I para la obtención de DNA.

Se agrega 1 volumen de P:C:I, se agita violentamente por 3 minutos y se centrifuga en microcentrífuga por 15 segundos a 14,000xg. Se saca la fase superior que contiene el DNA y se descarta la fase inferior orgánica. Se somete a una nueva extracción con P:C:I y luego de centrifugar, cuidadosamente se recuperan 2/3 de la fase acuosa.

8.4. Precipitación de DNA con alcohol.

A la fase acuosa recuperada se agrega Na Acetato a una concentración final de 0.19 M, y se agrega a la mezcla 1 volumen de alcohol absoluto frío. Se mezcla bien para precipitar el DNA de alto peso molecular y se mantiene a -20°C a lo menos 1 hora. Luego, se centrifuga a 14,000xg en una microcentrífuga por 35 minutos, el pellet se lava con 70% Etanol dos veces, y se resuspende en un volumen mínimo de agua desionizada estéril y se determina la concentración a 260 nanómetros por medio de un DNA Gene Quant determinator (Pharmacia, Suecia)

8.5 Diseño de Iniciadores para PCR:

Se diseñaron iniciadores específicos contra la región de DNA ribosomal de *P. salmonis*, para amplificar fragmentos de tamaños bien definidos. Se esperaban fragmentos de 93, 183, 284, 305 o 375 pares de bases respectivamente.

8.6 Amplificación por PCR.

Se utilizó un procedimiento estándar, con 30 ciclos, de acuerdo a Orrego y col. (comunicación personal)

9. Construcción de sondas liposomales

9.1 Preparación de las muestras

Las muestras de lípidos y de lipopolisacáridos (LPS) se preparan en una relación de concentración molar de 50:1 y en una proporción de volúmen de 10:1 respectivamente, de acuerdo a métodos de preparación de liposomas estandarizados en nuestra Universidad (Sotomayor, 1997).

Las muestras de LPS utilizadas proceden de muestras de órganos de peces infectados de diferentes especies de salmonídeos correspondientes a Salmón coho y Trucha arcoiris.

De esta manera se prepara una solución de fosfatidilcolina 0.5 mM (Sigma Chemical Co.) en 1.0 ml de cloroformo Uvasol (Merck). La muestra de LPS se utiliza a una concentración de 0.01 mM en 100µl de etanol Uvasol (Merck).

9.2 Obtención de Liposomas

En tubos de vidrio previamente lavados con HNO₃ se mezcla 1.0 ml de fosfatidilcolina 0.5 mM en cloroformo con 100µl de LPS 0.1 mM en etanol y se secan bajo corriente de N₂. Luego se mantiene a vacío durante 2 horas y se resuspende en 1.0 ml de tampón HEPES 10 mM pH 7.4 con 145 mM NaCl en H₂O Omnisolv HPLC Merck.

Se realizan 5 ciclos alternados de 3 min cada uno de agitación en vortex seguido por incubación en baño de agua a 30°C, para la obtención de liposomas con LPS incorporado.

Con la finalidad de separar los liposomas del LPS no incorporado la muestra se centrifuga a 100.000xg durante 1 h a 4°C, recuperándose el pellet de liposomas.

Alternativamente la muestra se puede filtrar por extrusor, utilizando filtros de policarbonato (Nucleopore) de diametro de poro definidos según el tamaño de liposomas que se deseen obtener.

10. Evaluación de Liposomas

10.1. Microscopía de luz

Los liposomas sedimentados previamente por centrifugación y resuspendidos en 100 μ l de tampón se observan en microscopio de luz, utilizando campo claro con la finalidad de verificar su formación y evaluar los tamaños obtenidos.

10.2. Análisis por Dot Blot

La incorporación de LPS en la monocapa externa de la matriz lipídica de liposomas recuperados por centrifugación se verifica por análisis de dot blot utilizando anticuerpos policlonales anti-*Piscirickettsia salmonis* obtenidos en conejo.

Básicamente, 1 μ l de cada muestra se depositan en una membrana de nitrocelulosa (Amersham), se seca bajo corriente de aire caliente y se deja en estufa a 80°C durante 30 min. Luego la membrana se incuba con BSA 3% - PBS pH 7.2 durante 12 hr a temperatura ambiente. Como primer anticuerpo se utiliza IgG anti-LPS en una dilución de 1/250 en BSA 3%-PBS pH 7.2 durante 1 hr a 37°C. Posteriormente la membrana se lava 3 veces con PBS durante 20 min cada ciclo. Para reconocer y revelar las uniones específicas del anticuerpo con el LPS presente en la muestra, la membrana se incuba con 0.2 μ g/ml de proteínaA ligada a HRP (Sigma Chemical Co) durante 1 hr a 37°C. La actividad enzimática de peroxidasa se revela con DAB y NiCl₂ (Harlow y Lane,1988). También se ensayan las fracciones sobrenadantes correspondientes a cada muestra de liposomas precipitados por centrifugación. Como control positivo se utilizan las muestras de LPS utilizadas en la preparación de liposomas. Como control negativo se

emplean liposomas preparados en ausencia de LPS, como también lipopolisacáridos procedentes de *Escherichia coli* y las siguientes muestras de lípidos comerciales (Sigma Chemical Co.): fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol, fosfatidilcolina, esfingomiélinea, fosfatidilserina y ácido fosfatídico.

RESULTADOS

1. Obtención de muestras

A pesar de haber recibido sobre 400 muestras, algunas de ellas no llegaron a nuestro laboratorio en Valparaíso en condiciones adecuadas pero igualmente fueron procesadas y algunas de ellas tuvieron que ser descartadas por un grado significativo de proteólisis. Se han procesado 272 muestras confiables de órganos (hígado, riñón y bazo) y sueros (individuos sanos y enfermos) de smolts, adultos y reproductores de Salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) y Salmón del Atlántico (*Salmo salar* L) y de juveniles, adultos y reproductores de Trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*), como se indica en la Tabla 1 (Anexo 2)

2. Purificación y caracterización de antígenos de *P. salmonis*

El procedimiento utilizado, diseñado en nuestro laboratorio, permite una purificación bastante adecuada de las bacterias. De las alternativas probadas (Gradientes de sacarosa, gradientes de ficol, gradientes mixtas de ficol-sacarosa y gradientes de rinografina), las gradientes discontinua de ficol, a pesar de tener un grado de resolución alto comparativamente entrega una menor cantidad de bacterias, y por esa razón se descartó. Adoptamos por lo tanto, lo que dio los mejores resultados tanto desde el punto de vista cualitativo como cuantitativo, y ello fue el uso de gradientes discontinuas de Sacarosa-Ficol y de gradientes discontinuas de Rinografina. Con estas últimas se obtiene una interfase entre las concentraciones 21 y 28 % con casi nula contaminación de tejidos y pigmentos (Figura 1). El protocolo definitivo es el siguiente:

Tejido en buffer HN - Homogenización en Ommimixer con tres ciclos de 1 minuto a máxima velocidad - Filtrado por nylon (mesh 50um) - Clarificación del homogenado a 1,000xg por 3 minutos -Centrifugación del sobrenadante a 3,600xg por 30 minutos -

Resuspensión del pellet en buffer HN y homogenización manual (Potter) con 10 golpes de émbolo - Separación en colchón de sacarosa al 15% en buffer HN por centrifugación a 3,600xg por 30 minutos - resuspensión del pellet en buffer HN y separación en colchón de sacarosa al 50% en buffer HN por centrifugación a 3,600xg por 30 minutos - resuspensión del pellet en buffer HN y depositarlo en gradiente discontinua mixta de 10 % Ficol 50% sacarosacentrifugando a 27,000xg por 1 hora. Las rickettsias quedan en la interfase, las que se recuperan y lavan profusamente en buffer HN con centrifugaciones a 3,600xg por 30 minutos. El pellet del último lavado se resuspende en volumen mínimo de buffer HN y se deposita en una gradiente discontinua de 4-21-28% de Rinografina en buffer HN y se centrifuga a 27,000xg por 1 hora. Las bacterias purificadas se obtienen en la interfase 21-28%, las que se recuperan libres de contaminantes (1/3 de la banda-región central-flecha figura 1) y después de lavados sucesivos se resuspenden en volumen mínimo de buffer HN para su cuantificación y uso..

Durante los diferentes pasos del protocolo de purificación de *Piscirickettsia salmonis*, las bacterias se detectaron en las diferentes fracciones mediante el examen al microscopio de preparaciones teñidas con Naranja de Acridina (FIG). Con esta tinción las bacterias solas o en agrupaciones aparecían fluorescentes y claramente diferenciables del background oscuro. La Figura 2A muestra el resultado de la tinción de la interfase de una muestra de coho. La Figura 2B el control positivo de la cepa tipo EM-90. La Figura 3 muestra la tinción por inmunofluorescencia específica usando el anticuerpo anti *P. salmonis* generado en conejos como primer anticuerpo y un anti-conejo marcado con fluoresceína como segundo anticuerpo (IFAT), confirmando la especificidad de la reacción de naranja de acridina..

Para determinar si podrían existir diferencias en la concentración del patógeno en cada uno de los tres órganos procesados por pez (hígado, bazo y riñón), se hizo el análisis y la purificación de cada órgano por separado.. A la vez, se analizó cada una de las fracciones producto del procesamiento subcelular, para obtener un perfil proteico

comparativo. Se usaron especímenes de coho y de trucha enfermos y un control sano (Figuras 4 y 5).

Para la caracterización de los componentes estructurales polipeptídicos de *P. salmonis* hemos usado referencialmente las interfases parcialmente purificadas como base del análisis comparativo, dado que esta fracción aparece relativamente pura a microscopía óptica y con un claro perfil polipeptídico cuando estos se comparan con el perfil de la cepa tipo crecida "in vitro" (Figura 6). Estos perfiles fueron similares a los observados cuando se hizo una extracción diferencial de los extractos para enriquecerlos en componentes hidrofóbicos. Para hacer el análisis comparativo válido, la Tabla 4 muestra la concentración proteica de las diferentes fracciones obtenidas mediante la solubilización con el detergente Triton X-114, instrumento discriminador de hidrofobicidad.

La caracterización del componente lipopolisacárido (LPS) de *P. salmonis*, de carácter netamente hidrofóbico, se realizó a partir de las muestras de peces enfermos y sanos después de ser solubilizadas con Triton X-114. Las Figuras 7 y 8 muestran la electroforesis en geles de poliacrilamida al 12% de los homogenados teñido con nitrato de plata para LPS; las muestras de LPS de salmón coho enfermo, trucha enferma y el control positivo EM-90 presentan bandas de bajo peso molecular, menor a 14 Kd (flecha en las figuras), lo que indica que estas moléculas podrían representar un lipopolisacárido del tipo R, si se compara con el LPS correspondientes a *Salmonella minnesota* R5 (carril b) que los posee de éste tipo..

Para verificar que la presencia del componente de bajo peso molecular correspondía verdaderamente a un LPS, se realizó la prueba del ácido tiobarbitúrico que detecta específicamente el componente del KDO, molécula exclusiva de los lipopolisacáridos. Cualitativamente detectamos el KDO en muestras provenientes de peces enfermos y en el control positivo (*E. coli*), sin que se detectara reacción colorimétrica visible en muestras provenientes de individuos sanos (datos no mostrados). Para reconfirmar la presencia del LPS en nuestras muestras, se resolvieron en un gel de 20% después de

tratamiento con Proteinasa K, como se muestra en la Figura 9. Además también se observó en los geles la aparición de una banda proteica (Figura 10, flecha) en las muestras de los tres tipos de peces enfermos analizados después de la solubilización con Triton -114: salmon salar, salmón coho y trucha arcoiris coincidiendo con la banda en el control *P. salmonis* EM-90.

Otra manera de comprobar la presencia del LPS en la muestras y verificar su potencialidad inmunogénica del mismo, fue correr genes paralelos de 10 % de poliacrilamida y uno de ellos tratarlo con Con-FITC que sólo reconoce radicales carbohidratados presentes en el LPS, y el otro someterlo a Western blot y revelarlo con el anticuerpo policlonal de conejo anti *Piscirickettsia* como primer anticuerpo (Figuras 11 A y B respectivamente).

El análisis por Western blot de las muestras de lipopolisacáridos después de tratadas con Proteinasa K y separados en un gel 12%, ratifica su especificidad y su potencialidad inmunogénico, como lo demuestra la Figura 12. En la Figura 13 se muestra en el Western blot, además de la especificidad inmunogénica de los LPS para salmón salar y trucha arco iris, la reacción de la proteína observada en la Figura 10 con el anticuerpo policlonal de conejo anti-*P. salmonis* en todas las muestras analizadas.

El análisis antigénico de las proteínas de *P. salmonis* se realizó utilizando fracciones purificadas post ficol-sacarosa resueltas en geles de poliacrilamida al 10% e incubadas con el anticuerpo policlonal de conejo, que como es sabido fue generado usando la cepa control EM-90 como inductora. La Figura 14 muestra, como era de esperar, la fuerte reacción de la cepa de referencia (carril i), donde destacan una proteína de alrededor de 30-40 Kd de peso molecular (flecha simple) y muy fuertemente el LPS (doble flecha). Como se puede observar, las proteínas de las bacterias aisladas provenientes de peces infectados NO reaccionan tan eficientemente contra el anticuerpo de conejo, excepto con el LPS que nuevamente aparece como un buen inmunógeno, independiente del origen y especie analizada. Repetidos ensayos han demostrado muy

poca reactividad de las proteínas presentes en las fracciones semipurificadas con el suero de conejo anti *P. salmonis*. Por otra parte la baja o nula potencialidad inmunogénica de las proteínas de los aislados naturales de *Piscirickettsia salmonis* queda claramente demostrado al realizar Western blots con las mismas muestras analizadas en la Figura 14, pero incubadas con inmunoglobulinas obtenidas de peces infectados, como se observa en las Figuras 15 incubada con suero de salmón coho como primer anticuerpo, Figura 16 con suero de trucha y Figura 17 con suero de salar. Sólo el suero de coho (Figura 15) reconoce bien la proteína de 50 Kd (flecha) y el LPS (doble flecha) de la cepa tipo (carril i), pero no así las de muestras de peces infectados (carriles a - h), aunque en todas estas últimas hay un claro reconocimiento del LPS, que aparece como el mejor inmunógeno. El suero de trucha (Figura 16), pareciera reconocer aunque muy debilmente la proteína de 50 Kd de la cepa tipo (carril i), pero no la de las muestras de campo, aunque en ellas si reconoce muy bien el LPS así como el de la cepa tipo. El suero de salar (Figura 17), sólo reacciona y debilmente con el LPS tanto de la cepa tipo como de las muestras de peces infectados (doble flecha).

Como una manera de comprobar el reconocimiento del anticuerpo policlonal anti-*Piscirickettsia* generado en conejo, sobre las muestras del agente patógeno presente en aislados naturales, procedimos a efectuar inmunoprecipitaciones de extractos crudos de peces infectados, usando el anticuerpo de conejo como el primero, y la Proteína A de *Staphylococcus aureus* como el segundo anticuerpo. Las muestras tratadas y no tratadas fueron resueltas en un gel de poliacrilamida al 12% y las proteínas visualizadas con tinción de Nitrato de Plata. De haber reacción, se esperaría que en las muestras tratadas apareciera un enriquecimiento de la bacteria y con un claro predominio del LPS. Este es el caso, como se observa claramente en la Figura 18, donde el LPS aparece como una mancha clara con la tinción, indicado con una doble flecha, sin que aparezca en los carriles b y c que corresponden a un control de pez sano.

3. Purificación de anticuerpos anti *P. salmonis* de suero de peces

La sangre obtenida de peces infectados y sanos fue separada por centrifugación en sus componentes celular y soluble, de los cuales este último corresponde al suero. El suero fue precipitado con Sulfato de Amonio para enriquecer en forma específica en las Inmunoglobulinas, las que fueron desalinizadas ya sea usando los Sigma Filters de corte sobre 30 Kda de peso molecular o bien columnas preformadas en Sephadex G-50 para ser luego cuantificadas por Bradford. La Tabla 5 muestra el análisis comparativo de los contenidos de proteínas obtenidas de 15 muestras de sueros analizados en paralelo por los dos métodos y de cuyo resultado se prefirió seguir, por su reproducibilidad, sólo con el método de separación por Sephadex. La Tabla 6 muestra las concentraciones de los 100 sueros purificados y seleccionados.

4. Generación de anticuerpos policlonales monoespecíficos

La generación de anticuerpos policlonales monoespecíficos se ha realizado inyectando en ratones las fracciones semipurificadas de aislados naturales de salmon coho, salmon salar, trucha arcoiris y un aislado a partir de cultivo, la cepa *P. salmonis* EM-90. La Figura 19 - I, muestra el perfil electroforético de los anticuerpos purificados en un gel de 12% de poliacrilamida, donde se indican con flechas los dos componentes estructurales de las Inmunoglobulinas G esperadas. La Figura 19 - II, muestra el resultado del mismo gel analizado por Western blot, donde específicamente se reconocen las cadenas livianas y pesadas de las inmunoglobulinas de ratón.

La Tabla 3 muestra el resumen de los resultados del ensayo de Dot Blot demostrando la especificidad reactiva de los anticuerpos policlonales monoespecíficos productos de las inmunizaciones de ratones. Todos los anticuerpos presentan una alta reactividad frente a su propio antígeno, excepto el aislado de Salar que no dio Inmunoglobulinas reactivas. Lo mas importante es que ninguno reacciona con el complejo proteico Albúmina de Suero Bovino, BSA, utilizado como control negativo.

También se indican la existencia de algunas reacciones cruzadas aunque débiles de los anticuerpos.

5. Análisis comparativo de los polipéptidos obtenidos

Los análisis por Western blots explicitados en el punto 2 de los resultados sugieren que el LPS aparecería como el mejor inmunógeno tanto para el suero de conejo anti *P. salmonis* como para algunos sueros obtenidos de peces infectados. Sin embargo esto necesita una comprobación mas amplia. En la actualidad nos encontramos realizando el catastro masivo con los 100 sueros seleccionados, purificados y cuantificados, lo que nos permitirá concluir en forma definitiva y será parte del informe final del proyecto.

6. Detección de *P. salmonis* en sueros por la técnica de PCR.

Con el objeto de analizar la posibilidad de encontrar cantidades trazas del agente patógeno tanto en muestras pequeñas de tejidos, pero esencialmente en sueros, para poder generar una técnica rápida, masiva y confiable de diagnóstico del agente quisimos utilizar la técnica de PCR en el desarrollo del proyecto. Procedimos a extraer DNA de 50 microlitros (ul) de suero de peces enfermos y sanos y usando iniciadores de la polimerización especialmente diseñados para el DNA ribosomal de la cepa tipo, amplificamos en forma selectiva el DNA del agente. Si éste se encontrara presente en las muestras analizadas, tendría que dar fragmentos de DNA acordes al tamaño esperado según el o los iniciadores usados. Se utilizaron 4 pares de iniciadores diferentes que debieran dar tamaños de amplificación también diferentes pero también muy exactos y definidos. La Figura 20 muestra el resultado específico de la amplificación utilizando la cepa tipo EM-90. Los carriles A, E y H tienen los marcadores de peso molecular, de 100 en 100 nucleótidos. El carril B, es el control negativo con DNA de suero de un pez sano donde sólo aparece la banda de los iniciadores al final del gel (marcado con una flecha). Los carriles C, D, F, y G, muestran los 4 amplificados específicos correspondientes a la respuesta esperada acorde a los pares de iniciadores utilizados. La Figura 21 muestra el

resultado obtenido al usar un par de iniciadores para el DNA extraído de la cepa tipo y de sueros de 5 muestras de peces infectados y 3 controles sanos. Los carriles A y K corresponden a marcadores de peso molecular. Los carriles B a la cepa tipo EM-90, la C y D a dos muestras de coho, los E y F a dos muestras de Trucha, y el carril G. a una muestra de salar enfermo.. Los carriles H, I y J, corresponden a muestras de controles sanos de coho, trucha y salar, respectivamente. Con esto queda claramente demostrada la especificidad de la reacción y la potencialidad ilimitada de la técnica que será discutida en mas detalle en el informe final.

7. Construcción de sondas liposomales.

Las sondas liposomales construídas con fosfatidilcolina y LPS procedente de diferentes especímenes infectados de Salmón coho y de Trucha arcoiris se muestran en las Figuras 22A y 22B respectivamente. Se observan liposomas recuperados por centrifugación, los que presentan una morfología muy similar y característica de vesículas lipídicas con un rango de tamaños aproximadamente entre 100 μm y 200 μm .

El estudio por dot blot para la presencia de LPS en los liposomas obtenidos por centrifugación se muestra en la Figura 23A. Se observa una reacción positiva en todas las muestras de liposomas analizadas (muestras 5-8). También se observa reacción positiva pero de menor intensidad en las fracciones sobrenadante 2 y 3, que corresponde a la reacción con el inmunógeno no se ha incorporado al liposoma y que permanece por lo tanto en solución.

La Figura 23B muestra los resultados del control negativo correspondiente a la muestra de LPS de *E. coli* (muestra 1) y de los controles positivos correspondientes a muestras de LPS procedentes de los diferentes especímenes de Salmón coho infectados (muestras 2 y 3) y de Trucha arcoiris (muestra 4), las cuales habían sido utilizadas anteriormente en la preparación de liposomas.

Todas las muestras de lípidos comerciales utilizadas en el ensayo por dot blot dieron resultados negativos.

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

A pesar que las muestras de tejido fueron obtenidas y recuperadas de los especímenes de campo según metodologías precisas previamente establecidas y acordadas con las empresas participantes, por falencias en el proceso de envío desde los Centros a Puerto Montt y de allí a Valparaíso, algunas de ellas que venían sin congelar resultaron tener un nivel de proteólisis significativo razón por lo cual no pudieron ser consideradas en nuestro análisis final. Así, se procesaron 272 muestras confiables de más de 400 recibidas, de todas maneras sobrepasando el número propuesto por nosotros al postular a la licitación. Sin embargo, gran parte de las muestras de sangre recibidas inicialmente de los centros de cultivo de la X Región, venían con lisis evidente del componente celular sanguíneo, razón por la cual la obtención de las inmunoglobulinas de la correspondiente fracción sérica fue imposible. Es por ello que sólo 100 muestras fueron recuperadas en forma óptima y que por ende nos permitió hacer el análisis cuali y cuantitativo de respuesta humoral inducida por el agente, *intra e inter* especies, y la representatividad de ellas fue la siguiente: de salmón coho-enfermos el 41 %, y de sanos el 37.2%; de salmón salar-enfermos el 84.2% y de sanos el 80 %; de trucha enfermas el 34.6% y de sanas el 62.1%. Esta merma tan importante se debió, a nuestro juicio, a una mala aplicación de la técnica de extracción de sangre de cada pez. Esta situación fue comprobada en terreno y mejorada por la visita de parte del grupo de investigadores del proyecto a las pisciculturas en cuestión donde tuvimos la precaución de enseñar al personal de campo la manera correcta de procesar las muestras para poder hacer el análisis propuesto en el proyecto. La principal dificultad que no nos permitió ni siquiera intentar analizar las muestras con lisis de los componentes celulares de la sangre, es que ese proceso libera una gran cantidad de proteasas intracelulares que se sabe afectan en forma significativa el nivel cuantitativo de anticuerpos presentes en la fracción sérica, el sustrato que nosotros necesitamos intacta para hacer el análisis cuali y cuantitativo de la potencial respuesta inmune humoral inducida por el agente en cada pez enfermo y de cada especie analizada. Mejoramos esta situación a conformidad, lo que nos permitió

contar con un número adecuado de muestras en este rubro, para sacar conclusiones generales reproducibles y confiables.

Por otra parte los problemas iniciales que tuvimos que enfrentar para lograr una adecuada resuspensión de las muestras de tejidos e inmediatamente después su homogenización para obtener el fraccionamiento subcelular que nos permitió purificar el agente, fueron resueltos a cabalidad y el protocolo final diseñado para tal efecto se detalla en la sección Metodología de este informe final. Independiente de ello, y con ese problema solucionado, los resultados obtenidos inicialmente en la etapa de purificación de la *Piscirickettsia salmonis* basada en la utilización de centrifugaciones diferenciales isopícnicas con soluciones de matrices inertes de diferentes y conocidas densidades (por ejemplo, sacarosa, percol o ficol), no fueron del todo satisfactorios, ya que el análisis de las interfases provenientes de las distintas gradientes demostraban siempre la presencia de una contaminación con componentes tisulares del pez. Esto teníamos que solucionarlo dado que necesitábamos el agente purificado al máximo para no quedar con la interrogante si esta contaminación, por pequeña que fuera, no pudiera tener alguna incidencia en la evaluación inmunológica de respuesta humoral que luego queríamos realizar usando la respuesta al agente inducida tanto en conejos como en ratones para compararla con la respuesta natural que induce el agente en los peces afectados. Afortunadamente logramos superar este inconveniente al incluir la Rinografina como matriz de sustento en la última purificación por gradientes, la que gracias a su osmolaridad diferencial permitió no solo resolver adecuadamente las bacterias del tejido del pez, sino también limpiar la muestra de una gran cantidad de pigmentos que la contaminaban. Así las gradientes de Rinografina constituyeron la alternativa más adecuada para la etapa final de la purificación de las rickettsias, y por ello la definimos como el mecanismo estándar de purificación en nuestro estudio. La interfase obtenida de éste tipo de gradientes es la que se utilizó como fuente de antígenos para la inducción de anticuerpos policlonales monoespecíficos en ratones.

Aunque las técnicas de tinción Gram y Giemsa son utilizadas ampliamente en el diagnóstico y caracterización del agente causal de la Piscirickettsiosis en los centros de cultivo, en este trabajo estas técnicas no han resultado del todo aplicables, probablemente debido a que el tampón de alta fuerza iónica que tuvimos que utilizar en el procesamiento de las muestras de tejido para conservar al máximo la integridad del agente durante el fraccionamiento subcelular, aparentemente dificulta la diferenciación entre bacterias y tejido animal. Esta situación pensamos se debe a que la alta concentración de NaCl que simula la constitución del agua de mar, condición en la cual se sabe la bacteria es infectiva y por ende la asumimos integralmente intacta, también es sabido que induce la formación de abundantes *microsomas* con los restos membranosos celulares provenientes del fraccionamiento, los que fácilmente se confunden con bacterias, generando así falsos positivos. En este sentido, obtuvimos mejores resultados utilizando las técnicas basadas en elementos fluorescentes como herramientas discriminadoras. Así, la tinción con naranja de acridina y la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFAT) producen un mayor contraste entre las rickettsias y el tejido, donde los microsomas no interfieren. Aunque la tinción con Naranja de Acridina es más simple y rápida, indudablemente la inmunotinción (IFAT) es la más específica y la que adoptamos como técnica de rutina para realizar nuestros catastros.

En relación a la evaluación cuantitativa de las bacterias obtenidas de "in vivo", no observamos diferencias significativas en el contenido y calidad del patógeno asociado a cada uno de los tres órganos procesados por pez infectado, a saber, hígado bazo y riñón. Por lo tanto realizamos el análisis y purificación del agente a partir de un pool de los tres órganos obtenidos de cada pez. Esto nos hace pensar que talvez no existiría un órgano preferencial para la infección de parte del agente, la que se constituiría en una infección esencialmente sistémica. De ser así, no se requeriría de receptores específicos para infectar un tipo celular definido, lo que conlleva a pensar que tampoco se requeriría de variantes genéticas diferentes de la bacteria infectando a cada una de las tres especies de salmónidos analizados. Esta es una interpretación que no ha estado presente en la escasa literatura existente sobre el agente y la sacamos a colación ahora para resaltar que

tampoco existe evidencia experimental, ni siquiera preliminar, que avale el hecho de la existencia de un órgano blanco preferencial para la infección del patógeno. Por otra parte, y aunque la cantidad de patógenos circulantes en el suero no ha sido cuantificada, nuestros resultados con PCR sugieren que es impactantemente abundante. Esto bien podría significar la posibilidad de que exista infección productiva en las células sanguíneas del pez, lo que no ha sido reportado experimentalmente, pero que bien podría constituir una razonable explicación de la pobre respuesta inmunológica humoral que observamos consistentemente a lo largo del desarrollo del proyecto.

La decisión de utilizar una alternativa al fraccionamiento subcelular en la purificación del agente mediante un método de extracción que enriqueciera en componentes hidrofóbicos, por ser éste tipo de macromoléculas representativas de las membranas externas de los patógenos, y que además es la condición químico-física que presentan algunos de los mejor caracterizados factores de virulencia bacterianos, arrojó resultados inesperadamente estimulantes. Como base de la extracción alternativa de las muestras homogenizadas utilizamos el detergente ligeramente iónico Triton X-114. Con él, en forma simple y diferencial y además, cuantitativamente significativa, hemos podido enriquecer potenciales marcadores de superficie de *Piscirickettsia salmonis*, tales como algunas proteínas hidrofóbicas, pero principalmente los lipopolisacáridos (LPS) que forman parte de la membrana externa de las bacterias gram negativas, y en general, son los "blancos" del sistema inmune del hospedador al estar más expuestos a la acción defensiva del mismo. Así, y dado que ambos métodos confirmaron que el componente LPS bacteriano representa ser el mejor inmunógeno del microorganismo, decidimos hacerle una mejor caracterización.

Así, detectamos cualitativamente la presencia de KDO, componente exclusivo del lipopolisacárido en un grupo representativo de muestras de peces afectados por Piscirickettsiosis. Por el contrario, las muestras de peces sanos control resultaron negativas para el componente lo que sugiere que el LPS detectado pertenece al agente causal de la Piscirickettsiosis. El análisis electroforético de dichas muestras ha mostrado

la presencia de bandas de bajo peso molecular que son resistentes a la digestión con proteínasa K y que presentan un patrón correspondiente a un lipopolisacárido del tipo R, comparado con los LPS de otras bacterias Gram negativas. Las tres especies en estudio, salmon salar, salmón coho y trucha arco iris muestran la presencia del LPS, el que a su vez, parece ser equivalente en las tres especies de salmones analizados.

Por otra parte y en concordancia con lo discutido en párrafos anteriores, el análisis de la potencialidad antigénica de las proteínas de *P. salmonis* purificados realizado utilizando la técnica de Western Blot, sugiere que ellas no son buenos inmunógenos. Esta conclusión se logra ya que los componentes estructurales del agente purificado frente tanto a sueros de conejo y de ratón previamente expuestos a la bacteria, como a las Inmunoglobulinas M purificadas de los sueros de peces infectados que reflejan la respuesta natural inducida en los peces por el agente, a lo más detectan UNA proteína reactiva, de aproximadamente 30 - 40,000 daltons de peso molecular, y que además reacciona muy débilmente. Al principio pensamos que se trataba de un problema de concentración de proteínas, pero repetidas experiencias nos indicaron que efectivamente la reactividad de las proteínas de *P. salmonis* es extraordinariamente baja. Más aún, encontramos que el suero de conejo anti-*P. salmonis* reacciona con algunas proteínas de células de cultivo, específicamente de la línea CHSE-214, la cual es la rutinariamente empleada para el crecimiento de *P. salmonis* "in vitro". Estos resultados eran de esperar, ya que todos los sueros anti-*P. salmonis* existentes reportados por la literatura, incluyendo al que nosotros teníamos inicialmente, fueron generados por inyección de preparados crudos semipurificados que contienen no sólo los correspondientes antígenos bacterianos, sino también antígenos que corresponden a proteínas de la línea celular mencionada, que incluso pueden actuar como mejores inmunógenos que los bacterianos en hospedadores como el conejo. Nuestros preparados del agente purificado por gradientes de Rinografina además de soslayar este problema, por tratarse de agentes provenientes de muestras "in vivo" y no "in vitro", no presentan este inconveniente, y por ende, nuestra apreciación de la baja inmunogenicidad proteica de la *Piscirickettsia salmonis* está debidamente respaldada experimentalmente. Reconocemos, sin embargo

que existe una limitante, la que nos hace ser cautelosos en aceptar esta conclusión como definitiva: Como decíamos antes, el único anticuerpo con que se cuenta en la mayoría de los laboratorios donde se ha tratado de evaluar el problema, es el de la variedad policlonal e inducido en conejo para la cepa tipo del agente cultivada "in vitro". Primero, el organismo cultivado "in vitro" no necesariamente es idéntico al obtenido de "in vivo" y de diferentes órganos, especialmente para un patógeno intracelular cuya estrategia es vacuolizarse dentro de las células infectadas recubriéndose, por ejemplo, de proteínas celulares para pasar inadvertido. Segundo, lo que "ve" el sistema inmunológico del conejo para inducir una respuesta, basada fundamentalmente en inmunoglobulinas G, no necesariamente es equivalente a lo que "ve" el sistema inmunológico del pez para inducir una respuesta humoral basada sólo en inmunoglobulinas M, lo que significa que lo que es un buen inmunógeno en conejos no necesariamente lo es también en peces, y viceversa. Por lo tanto es crucial hacer una evaluación cuantitativa muy precisa de la respuesta que se obtiene "in vivo", y con una muestra estadísticamente significativa, situación que en nuestro caso, y para los 100 sueros de peces, no lo consideramos suficiente, a pesar de que anticuerpos monoclonales contra la rickettsia tipo aislada de ostiones de la costa mediterránea, obtenida gracias a un convenio que mantenemos con el Centro de Estudios de Patógenos Marinos del CNRS de Montpellier en Francia, nos demuestran que ellos tampoco reconocen ninguno de nuestros extractos de aislados naturales de salmónidos, ni siquiera el LPS. Esta observación, además de asegurarnos una vez más la especificidad de la reacción que observamos, nos indica que la *Piscirickettsia salmonis* no parece estar inmunológicamente relacionada con la rickettsia aislada de bivalvos marinos.

No obstante las proteínas del agente no parecen ser buenas inductoras de respuesta humoral, el componente lipopolisacárido (LPS) del agente si demostró una alta reactividad con el suero anti-*P. salmonis* de conejos y de ratón, y también con los sueros obtenidos de peces infectados. Ello indicaría que el LPS de estas bacterias es en sí, un muy buen inmunógeno. Sin embargo es importante destacar que no todas las muestras de aislados naturales reaccionaban inicialmente con la misma intensidad. El

aislado de referencia de *P. salmonis* obtenido a partir de cultivo "in vitro" mostraba un LPS que reaccionaba fuertemente con el suero tipo de conejo, patrón que se repetía con las bacterias purificadas de muestras de salmón coho provenientes de "in vivo". Sin embargo la intensidad de una reacción inmunológica equivalente del LPS provenientes de aislados de trucha arcoiris y salmón del Atlántico, no nos había sido posible hasta hace muy poco, en que obtenemos reacciones equivalentes con los aislados de las tres especies, como lo demuestran los nuevos experimentos que se incorporan a éste informe final representados en las figuras 10 y 13 del Anexo 3. Aunque seguimos sin descartar la posibilidad, aunque remota, que los LPS de los aislados de *Piscirickettsia salmonis* sean inmunológicamente diferentes, y que ésa diferencia esté relacionada con algún factor epidemiológico, como por ejemplo la especie de pez a partir de la cual ellos fueron aislados, creemos que se trataba sólo de un problema de carácter cuantitativo, específicamente de concentración del LPS por muestra de tejido inicial, alternativa que consideramos superada por los experimentos antes mencionados, pero que seguiremos evaluando en el futuro inmediato, como una continuación natural del proyecto.

Como componentes estructurales de la membrana externa de bacterias Gram (-), los lipopolisacáridos (LPS), tienen un rol importante en la interacción de dichas bacterias con organismos superiores. En la mayoría de los casos conocidos de patologías bacterianas, el sistema de defensa del hospedante reconoce la bacteria invasora principalmente por la estructura del LPS o endotoxina, reaccionando con ellos e induciendo la síntesis de anticuerpos dirigidos contra las diferentes regiones que lo componen. Por ello, en base a nuestros resultados y a los de otros autores recién publicados (1996) creemos que el LPS de *P. salmonis* puede constituir un elemento importante en la patogénesis de la Piscirickettsiosis y debería ser considerado en el diseño de estrategias de diagnóstico y prevención de la enfermedad.

Para realizar el análisis comparativo del potencial inmunogénico de los componentes estructurales del patógeno, y especialmente el LPS, utilizamos una serie de técnicas inmunológicas requeridas directa e indirectamente para llevar a cabo estos

análisis. Entre ellas, además de las que involucran microscopía de inmunofluorescencia, podemos mencionar la inmunodifusión en gel (Ouchterlony) para hacer catastros de muestras parcialmente purificadas, la inmunoelectroforesis en geles de agarosa, inmunotinción de antígenos y la inmunoprecipitación en solución como una alternativa adicional de enriquecimiento del agente en solución. Con todas ellas solo ratificamos las observaciones ya logradas son las muestras de tejidos, es decir, la baja inmunogenicidad de los componentes estructurales proteicos del agente, la superioridad cualitativa y cuantitativa en éste respecto del LPS y la aparente constancia de la calidad del mismo a través de las especies, destacándose coho sobre trucha y sobre salar, que notoriamente corresponde al sentido inverso de sensibilidad frente al agente detectada "in vivo".

Ahora queremos discutir con más detalle la construcción y el sentido de generar las sondas liposomales con las cuales cerramos nuestro proyecto proponiendo una estrategia teórica de vacunación. Los liposomas han surgido como elementos de gran utilidad para la introducción de moléculas bioactivas en organismos receptores, caracterizándose por su bajo costo y rapidez de producción. Por otra parte y una de las grandes ventajas que presentan estos elementos es el de ser biodegradables, el carecer de toxicidad y el de no presentar capacidad inmunogénica "*per se*". Por lo tanto, los liposomas representan un tipo de vehículo o vector ideal para introducir epítopes o regiones inmunoreactivas de patógenos en sistemas vivos, con la finalidad de conferir a estos huéspedes una resistencia sostenida a la enfermedad a través del tiempo.

Los liposomas en nuestro estudio fueron construídos solo en base a un fosfolípido, la fosfatidilcolina, dado que presenta dos ventajas comparativas principales frente a una gama de alternativas únicas y mixtas que pensamos utilizar, y una tercera cualidad, que aunque no primaria, nos ofrecía una seguridad de persistencia temporal una vez en el pez. La primera se refiere a su geometría molecular, tipo cilindro, lo que le permite formar bicapas lipídicas estables, es decir emulando membranas celulares naturales, a diferencia de otros fosfolípidos con forma molecular de cono ó cono invertido que tienden a desestabilizar la estructura de membranas tipo (Shinitzky, 1984). La segunda

ventaja se refiere a que es un fosfolípido neutro, sin carga, lo que favorece la estabilidad del liposoma (Chonn et al., 1992) en un entorno variable y desconocido como puede ser el torrente circulatorio del pez. La tercera, es que la región hidrocarbonada de liposomas contruidos con fosfatidilcolina, tienen una fase invariante entre 0° y 60°C, caracterizado por una microfluidez comparable a la de membranas biológicas (Shinitzky y Barenholz, 1974), lo que ofrece versatilidad de aplicación y de mantención de las sondas en el tiempo.

Nuestros liposomas (Figura. 24B) que incorporaron el LPS como inmunógeno en su superficie externa (Figura. 24C) representan sondas liposomales híbridas (Figura. 24A), las que una vez incorporadas a un organismo huésped deberían inducir a su sistema inmune a reaccionar única y exclusivamente contra el elemento exógeno de la superficie del liposoma, ya que la configuración liposomal es confundida con una estructura membranosa endógena. Así se prepara al sistema para cuando entre el patógeno al sistema ya existan anticuerpos contra él, favoreciendo su eliminación de manera específica y rápida. Ya se demostró previamente que el LPS de *Piscirickettsia salmonis* presenta la propiedad de ser un inmunógeno activo, por lo que su utilización en bajas cantidades en la construcción de liposomas, atenúa el potencial efecto tóxico que este pudiese ejercer "in vivo". Cabe destacar que la unión del LPS con el liposoma es al azar, y por lo tanto además de estar en la superficie pueden quedar incorporadas en la matriz lipídica o bien quedar atrapadas al interior de la vesícula lipídica. En el primer caso, su potencial inmunogénico es inmediato, en el segundo caso, es menos directo pero también de eficacia detectable desde el momento de la exposición al sistema, y el tercer caso, el más interesante, cuando la vesícula se abra o bien cuando la estructura tipo membrana tienda a fusionarse con algún sistema celular del pez, incluyendo las del sistema inmune, lo que favorecería la inducción mediata de la respuesta inmune tanto humoral como también celular. Bajo este punto de vista, la mezcla de liposomas con esta configuración al azar, además de disminuir el efecto de potencial toxicidad en el sistema que recibe el inmunógeno, asegura la persistencia de la respuesta al mismo en el tiempo, lo que le da ventajas innegables sobre una vacuna de tipo clásico.

Siendo más específico, es posible predecir la inserción de la molécula de LPS en una membrana al analizar su estructura básica, representada esquemáticamente en la Figura 24C. Presenta un dominio polar (1) y un dominio lipídico (2), denominado lípido A, que está formado por cadenas acílicas entre las que también se puede encontrar la fosfatidilcolina (Brock, 1979). Sería éste el dominio que le permitiría una directa y espontánea inserción a una membrana. Por otra parte, el dominio polar de la molécula está formado por residuos de carbohidratos y representan el epítoto reactivo de la misma. Este segmento inmunógeno del LPS puede quedar en dos orientaciones posibles, hacia el exterior del liposoma o con dicho dominio hacia el interior de la vesícula lipídica. Aunque estas dos orientaciones **no** se puedan controlar experimentalmente de modo de favorecer una orientación determinada, por ejemplo el de dejar el epítoto reactivo hacia el exterior del liposoma de manera que estimule al sistema inmunológico de salmonídeos en forma inmediata a su exposición, podríamos hipotetizar que dada la estructura de moléculas tipo LPS se favorecería una inserción del dominio lipídico en la membrana del liposoma con el dominio de carbohidratos orientado preferentemente hacia el exterior favoreciendo de esta manera la obtención de liposomas de capacidad inmunogénica. Esta orientación se fundamenta en que el ángulo de curvatura externa del liposoma es mayor que el ángulo interno, favoreciendo la disposición de estructuras ramificadas de moléculas. Así, la estructura propia del LPS favorecería tanto su inserción en la bicapa y lo que es más importante aún, su orientación adecuada, no requiriendo de la participación de otras moléculas "ligadoras", como es el caso de péptidos inmunógenos (Boeckler et al., 1996) que para que queden expuestos en la superficie del liposoma requieren necesariamente del uso de reactivos no inmunógenos que unan al péptido de interés al liposoma. Sin embargo ya hemos discutido que la formación de liposomas al azar asegura una protección sostenida en el tiempo, transformando a ésta estructura como un muy buen activador de la inmunidad del pez.

Como en la construcción de las sondas liposomales no todas las moléculas de LPS serán incorporadas al fosfolípido, habrá una fracción de estas moléculas en estado libre.

Dado que ellas presentan una solubilidad diferencial en solventes polares, necesariamente quedarán en solución, y por lo tanto es posible su remoción de los liposomas mediante una simple centrifugación, sedimentando los liposomas y permaneciendo en la fracción sobrenadante las moléculas libres de LPS, las que podrían ser utilizadas en un nuevo intento de encapsidación en la matriz fosfolipídica.

La evaluación de las sondas liposomales construídas se realizó mediante 3 técnicas complementarias: microscopía de luz, ensayo por dot blot y análisis por inmunodifusión. La primera de estas técnicas permitió determinar la formación de los liposomas y evaluar sus tamaños, pero no permitió visualizar la incorporación del LPS lo que incluso hubiese sido imposible de determinar incluso utilizando otro tipo de microscopía de mayor resolución como la microscopía electrónica. La incorporación del inmunógeno en la membrana del liposoma y en la orientación adecuada se determina por dot blot, puesto que esta técnica utiliza el anticuerpo anti-LPS que sólo puede reaccionar si el inmunógeno queda expuesto en la superficie externa del liposoma. Para inmunógenos incorporados en la superficie pero en orientación incorrecta, como también para las moléculas incorporadas al interior de la vesícula lipídica, la reacción con el anticuerpo es negativa. Nuestros resultados demuestran una reacción positiva para liposomas purificados por centrifugación (Figura 23 muestras 5-8), indicando por lo tanto claramente que el LPS presenta preferencialmente la orientación esperada, es decir con el dominio inmunógeno hacia el exterior. Esta misma información fue confirmada en la evaluación de los 100 sueros frente a los liposomas (datos no mostrados).

La capacidad inmunogénica que el LPS incorporado en el liposoma pueda presentar "*in vivo*" debe ser evaluado, y podría optimizarse a través de una variación en la microfluidez de la matriz lipídica de manera tal que el inmunógeno tenga una movilidad y una conformación óptima para la inducción del sistema inmune del organismo huésped. Se ha demostrado que la habilidad de anticuerpos para reconocer a sus inmunógenos es un proceso dinámico y muy relacionado con la accesibilidad del

epítoto reactante y con su movilidad (Tainer et al., 1985). Esta regulación del estado físico de la membrana puede lograrse, por ejemplo, construyendo liposomas de fosfatidilcolina pero que posean cadenas acílicas con diferentes grados de insaturación, puesto que la presencia de dobles enlaces contribuye a la fluidez de la bicapa y por lo tanto, a la movilidad del inmunógeno. Ello le permitiría adoptar la óptima conformación para su eficiente reconocimiento por el sistema inmune del organismo huésped. Otras alternativas viables para regular la fluidez del liposoma sería la de utilizar dos fosfolípidos diferentes en su construcción, como por ejemplo fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina, situación que ha sido de comprobada eficiencia "in vivo" (Shinitzky, 1984).

Otro aspecto importante a considerar es la estabilidad del liposoma en la circulación sanguínea de salmones, la que ha sido analizada desde el punto de vista de tamaño del liposoma y de su composición lipídica. En el primer caso la selección de poblaciones de liposomas de diferentes diámetros se puede realizar experimentalmente mediante filtración en un extrusor, que junto a la disminución en la concentración del ligando, aseguran una mayor estabilidad (Gregoriadis et al., 1993). En el segundo caso, éste tipo de análisis se ha realizado sólo en ratones (Chonn et al., 1992), demostrándose que la composición lipídica juega un rol determinante en la estabilidad y en consecuencia, en el tiempo que el liposoma se encontrará disponible en el torrente sanguíneo. Así, liposomas con carga negativa han demostrado ser muy inestables lo que se explicaría por una potencial interacción con diferentes proteínas del suero. También se ha hecho mención al grado de saturación de los fosfolípidos, lo que contribuye positivamente a su estabilidad o al uso equimolar de esteroides. Liposomas neutros, como los construidos en el presente trabajo, como aquellos con carga positiva, poseen una vida media mayor. Para terminar, y pensando en una eventual optimización de una sonda liposomal para ser aplicada comercialmente a salmones en cautiverio, queremos destacar que liposomas que contienen gangliosidos como componentes integrales presentan una mayor estabilidad en los sistemas circulatorios en que han sido evaluados. Es interesante destacar que estas moléculas presentan una gran similitud estructural con

los LPS bacterianos, sobretodo en la región de carbohidratos y de lípidos (Stryer, 1988). **Este valioso antecedente sumado a los resultados del proyecto, deja en condiciones a nuestro grupo de trabajo para diseñar una vacuna liposomal de alta eficiencia teórica, alternativa que dejamos en manos de la Subsecretaría para una consideración posterior.**

Finalmente queremos destacar nuestra incursión, fuera de programa del proyecto, en la técnica de la PCR asociada a la detección del agente en peces enfermos. El hecho que detectemos DNA del patógeno, aparentemente en gran cantidad en el suero de peces con síntomas evidentes de la enfermedad, **y en dos casos de peces reportados como sanos**, abre importantes alternativas adicionales no solo para lograr entender mejor la biología inmunología y epidemiología de la enfermedad, sino también, y entre muchas, para el diseño de catastros preventivos, determinación de incidencias en centros y regiones, análisis de potenciales vectores y generación de estrategias preventivas de uso masivo. Sin embargo, el punto más importante que quisieramos resaltar es la extrema sensibilidad de la técnica. En nuestras manos, y en forma irrefutable por la gran cantidad de controles que hemos utilizado, nos ha permitido detectar mínimas cantidades del agente en muestras extremadamente pequeñas de sangre (5 microlitros, es decir 0.005 ml, teniendo en consideración que de las pisciculturas nos enviaban 4 ml de sangre). Esto significa que la optimización de la técnica nos permitiría hacer catastros masivos "in vivo" para detectar PRESENCIA del agente en peces, incluso antes de que presenten sintomatología clinica específica, o bien en el período crítico de transición agua dulce-agua de mar. Esta eventualidad permitiría al patólogo de un Centro dado tomar las medidas terapéuticas adecuadas, incluso en ausencia de una vacuna, no sólo para controlar un brote, sino para limitar la transmisión del agente. Si proyectamos esta situación en forma teórica al sector productivo, permitiría tener, por ejemplo, un control sanitario de reproductores, regular el traspaso horizontal de especímenes entre pisciculturas, o incluso ser aplicada para definir ovas libres del patógeno. Creemos pues, que tenemos en esta técnica una alternativa promisoriosa de uso masivo a las pisciculturas del país como un resultado derivado del presente proyecto.

CONCLUSIONES

1. El análisis antigénico de *Piscirickettsia salmonis* purificada tanto a partir de cepas de cultivo como a partir de tejidos y de sueros de peces salmonídeos infectados indica que, en general, las proteínas estructurales del agente **NO** parecen inducir una respuesta humoral alta.
2. La observación anterior es válida para las tres especies de salmonídeos analizadas, a saber *Oncorhynchus mykiss*, *Oncorhynchus kisutch* y *Salmo salar*.
3. Independiente del origen del microorganismo, en las tres especies salmonídeas se detecta una significativa reacción inmunológica humoral contra el componente lipopolisacárido (LPS) del agente, el que aparecería por lo tanto como el mejor inmunógeno común.
4. El agente patógeno puede recuperarse tanto de tejidos en forma intacta desde el punto de vista estructural, y de sueros desde el punto de vista funcional (Material Genético), observación que abre nuevas perspectivas para el entendimiento de su biología.
5. No se detectan diferencias estructurales entre aislados del patógeno de las especies en estudio, a pesar de la diferente sensibilidad que ellas presentan al agente "in vivo".
6. No se detectan diferencias significativas en las respuestas inmunológicas *intra e inter* especies frente a aislados del patógeno, sugiriendo una potencial homogeneidad biológica y genética del agente que afecta las pisciculturas del sur de Chile.
7. La exitosa construcción de sondas liposomales con el mejor inmunógeno del agente, representa una alternativa teóricamente válida para el potencial control de la enfermedad en los Centros de cultivo nacionales.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Alday-Sanz, V., Rodger, H., Turnbull, A., Adams, A., and Richards, R.M. 1994. An immunohistochemical diagnostic test for rickettsial disease. **J. Fish Dis. 17: 189-191**

Blum, H., Beir, H. & Gross, H.J. 1987. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis 8: 93-94**

Boeckler, C., Frisch, B., Muller, S. & Schuber, F. 1996. Immunogenicity of new heterobifunctional cross-linking reagents used in the conjugation of synthetic peptides to liposomes. **J. Immunol. Methods 191:1-10.**

Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem. 72: 248-254**

Branson, E.J., Nieto Díaz-Muñoz, D. 1991. Description of a new disease condition occurring in farmed coho salmon, *Oncorhynchus kisutch* (Walbaum), in South America. **J. Fish Dis. 14: 147-156**

Bravo, S and Campos, M. 1989. Coho salmon syndrome in Chile. **Am. Fish. Soc. FHS Newsletter 17 (3): 3**

Bravo, S. 1994. Piscirickettsiosis in freshwater. **Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 14 (4): 137-138**

Brock, T.D. 1979. Biology of Microorganisms. Third edition. Prentice Hall.

Brocklebank, J.R., Evelyn, T.P., Speare, D., Armstrong, R.D. 1993. Rickettsial septicemia in farmed Atlantic and chinook salmon in British Columbia.. **Can. Vet. J. 34: 745-748**

Bustos, P., Entrala, P., Montaña, J. & Calbuyahue, J. 1994. Septicemia Rickettsial Salmonidea (SRS): estudio de transmisión vertical en salmon coho (*Oncorhynchus kisutch*). **Jornadas de Patología y Nutrición en el desarrollo de la Acuicultura, Puerto Montt. pp. 33-40**

Cevenini, R., Sambri, V., Pileri, S., Ratti, G. & La Placa, M. 1991. Development of transplantable ascites tumours which continuously produce polyclonal antibodies in pristane primed BALB/c mice immunized with bacterial antigens and complete Freund's adjuvant. *J. Immunol. Methods* **140**: 111-118

Chern, R.S., & Chao, C.B. 1994. Outbreaks of a disease caused by Rickettsia-like organisms in cultures tilapia in Taiwan. *Fish Pathol.* **29** (2): 61-71

Chonn, A., Semple, S.C. & Cullis, P.R. 1992. Association of blood proteins with large unilamellar liposomes in vivo. *J. Biol.Chem.* **267**:18759-18765.

Comps, M., Raymond, J. C. & Plassiart, G.N. 1994. Rickettsia-like organism infecting juvenile sea-bass *Dicentrarchus labrax*. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* **16**: 30-33

Cvitanich, J.D., Garate, N.O. & Smith, C.E. 1990. Etiological agent in a Chilean coho disease isolated and confirmed by Koch's postulates. *Am. Fish. Soc. FHS Newsletter* **18**(1): 1-2.

Cvitanich, J.D., Garate, O., Smith, C.E. 1991. The isolation of a rickettsia-like organism causing disease and mortality in Chilean salmonids and its confirmation by Koch's postulate. *J. Fish Dis.* **14**: 121-145

Desiderio, J. V. & Campbell, S.G. 1985. Immunization against experimental murine salmonellosis with liposomes-associated O- antigen. *Infection and Immunity* **48**: 658.

Evelyn, T.P.T. 1992. Salmonid Rickettsial Septicemia. In: Diseases of Seawater Netpen-reared Salmonid Fishes in the Pacific Northwest. M.L.Kent Ed. Publicación Especial. **Fisheries and Aquatic Sciences** **116**. Dept. Fisheries and Oceans. Nanaimo. pp. 18-19

Freda, P. J. 1995. Liposome Design and Vaccine Development. In: Vaccine Design: The subunit and Adjuvant Approach. Powell, M. & Newman J. Eds. Plenum Press, New York.

Fryer, J.L., Lannan, C.N., Garcés, L.H., Larenas, J.J., Smith, P.A. 1990. Isolation of a rickettsiales-like organism from diseased coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) in Chile. *Fish Pathol.* **25**: 107-114

Fryer, J.L., Lannan, C.N., Giovannoni, J., Wood, N.D. 1992. *Piscirickettsia salmonis* gen. nov., sp. nov., the causative agent of an epizootic disease in salmonid fishes. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **42**: 120-126

Fryer, J.L. & Lannan, C.N. 1996. Rickettsial Infections of fish. Oregon Agricultural Experiment Station Technical Paper 10.846.

Gaggero, A., Castro, E., and Sandino, A. M. 1995. First isolation of *P. salmonis* from coho salmon (*O. kisutch* - Walbaum), and rainbow trout, (*O. mykiss* - Walbaum), during the freshwater stage of their life cycle. *J. Fish Dis.* **18**: 277-279

Garces, L.H., Larenas, J. J., Smith, P. A., Sandino, S., Lannan, C.N. & Fryer, J.L. 1991. Infectivity of a rickettsia isolated from coho salmon *Oncorhynchus kisutch*. *Dis. Aquat. Org.* **11**: 93-97

Garces, L.H., Correal, P., Larenas, J. J., Contreras, J., Oyanedel, S., Fryer, J.L. & Smith, P. A. 1994. Finding of *Piscirickettsia salmonis* on *Cerathothoa gaudichaudii*. *International Symposium on Aquatic Animal Health, Seattle, USA.* pp.109.

Gerhardt, P., Murray, R.G.E., Costilow, R.N., Nester, E.W., Wood, W.A., Frieg, N.R. & Briggs Phillips, G. Eds. 1981. "Manual of Methods for General Bacteriology". American Society for Microbiology. Washington D.C. USA

Gregoriadis, G., Garcon, N., da Silva, H. & Sternberg, B. 1993. Coupling of ligands to liposomes independently of solute entrapment: observations on the formed vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* **1147**:185-193.

Harlow, E. and Lane, D. 1988. Antibodies. A Laboratory Manual. Harlow, E. and Lane, D. (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory.

Hitchcock, P. J. y Brown, T. M. 1983. Morphological heterogeneity among *Salmonella* lipopolisaccharide chemotypes in silver-stained polyacrylamide gels. *J. Bacteriol.* **154**: 269-270.

Harlow, E. and Lane, D. 1988. Antibodies. A Laboratory Manual. Harlow, E. and Lane, D. (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory.

Khoo, L., Dennis, L.P.M. & Lewbart, G.A. 1995. Rickettsia -like organisms in the blue-eyed plecostomus, *Panaque suttoni* (Eigenmann and Eigenmann). **J. Fish Dis 18:157:164**

Kuzyk, M.A., Thorton, J.C. & William, W.K. 1996. Antigenic Characterization of the Salmonid Pathogen *Piscirickettsia salmonis*. **Infect. and Immun. 64:5205-5210**

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

Laing, G.D. & Threakston, R. D. G. 1993. Immunization against *Echis ocellatus* (carpet viper) venom using liposomes incorporating immunostimulants: role of lipopolysaccharide in conferring protection in a mouse model. **Toxicon. 31: 615**

Lannan, C.N., Fryer, J.L. 1991. Recommended methods for inspection of fish for the salmonid rickettsia. **Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 11: 135-136**

Lannan, C.N., Ewing, S.A., Fryer, J.L. 1991. A fluorescent antibody test for detection of the rickettsia causing disease in Chilean salmonids. **J. Aquat. Anim. Health. 3: 229-234**

Lannan, C.N., Cvitanich, J.D. & Evelyn T.P.T. 1992. Rickettsial Diseases of Salmonids. Pacific Northwest Fish Health Protection Committee Informational Report 6. pp.11

Lannan, C., & Fryer, J. L. 1993. *Piscirickettsia salmonis*, a new pathogen of salmonid fish in Chile. **Fisheries Research 17: 115-121**

Lannan, C.N. & Fryer, J. L. 1994. Extracellular survival of *Piscirickettsia salmonis* **J. Fish Dis. 17: 545-548**

Le Gall, G., & Mialhe E. 1992. Purification of Rickettsiales-like organisms associated with *Pecten maximus* (Mollusca: Bivalvia): serological and biochemical characterization. **Dis. Aquat. Org. 12: 215-220**

Lin, M., DaVolio, J. & García, R. 1993. Cationic liposome-mediated incorporation of prostatic acid phosphatase protein into human prostate carcinoma cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 192:413-419.

Liu, D., Wada, A. & Huang, L. 1992. Potentiation of the humoral response of intravenous antigen by splenotropic liposomes. **Immunology Letters** 31. 177.

Mauel, M.J., Giovannoni, S.J. & Fryer, J.L. 1996. Development of polymerase chain reaction assays for detection, identification, and differentiation of *Piscirickettsia salmonis*. **Dis. Aquat. Org.** 26: 189-195

Miquel, A. 1997. Desarrollo de una bacterina para *Piscirickettsia salmonis*. **Comunicación personal.** Bios Chile, Santiago.

Nakhla, A. N., Banoub, J. H., Hernández-Borrell, J. & Keough, K. M. W. 1996. Incorporation of the lipopolysaccharide and polysaccharide from *Aeromonas salmonicida* into liposomes. **Journal of Liposome Research** 6:141-154.

Olsen, A. B., Evensen, O., Speilberg, L., Melby, H. P. 1993. "Ny" laksesykdom forårsaket av rickettsia. **Norsk Fiskeoppdrett.** 12: 40-41

Petrov, A. B., Semenov, B.F., Vartanyan, Y. P., Zakirov, M.M., Torchilin, V.P., Trubetskoy, V.S., koshinka, N.V., L'Vov, V.L., Verner, I.K., Lopirev, I.V. & Dmitriev, B.A. 1992. Toxicity and immunogenicity of *Neisseria meningitidis* lipopolysaccharide incorporated into liposomes. **Infect. and Immun.** 60: 3897-3903

Rodger, H.D., Drinan, E.M. 1993. Observation of a rickettsia-like organism in Atlantic Salmon, *Salmo salar* L, in Ireland. **J. Fish Dis.** 16: 361-369

Rodgers, C. J. 1990. Immersion vaccination for control of fish furunculosis. **Dis. Aquat. Org.** 8: 69-72

Sanchez-Ferrer, A., Bru R. & Carmona F. 1994. Phase separation of biomolecules in Polyoxiethylene Glycol Nonionic detergents. **Cut. Rev. Biochem. Molec. Biol.** 29(4): 275 - 313

Shinitzky, M. 1984. Physiology of membrane fluidity. Vols. I and II CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida.

Shinitzky, M. and Barenholz, Y. 1974. Dynamics of the hydrocarbon layer in liposomes of lecithin and sphingomyelin containing dicetylphosphate. *J.Biol. Chem.* 249:2652-2657.

Smith, P.A., Lannan, C.N., Garces, L.H., Jarpa, M., Larenas, J., Caswell-Reno, P., Whipple, M. & Fryer, J.L. 1995. Piscirickettsiosis: a Bacterin Field Trial in Coho Salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 15 (4) : 137-141

Smith, P.A., Smith, P.A., Vecchiola, I.M., Oyanedel, S., Garcés, L.H., Larenas, J. & Contreras, J. 1996. Antimicrobial sensitivity of four isolates of *Piscirickettsia salmonis*. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 16: 164-168.

Sotomayor, C.P. 1997. Preparación de Liposomas. Comunicación Personal. Laboratorio de Espectroscopía Molecular, Instituto de Química, Universidad Católica de Valparaíso.

Stryer, L. 1988. Biochemistry, Third edition. W.H. Freeman and Company, New York.

Su, D. & Van Rooijen, N. 1986. The role of macrophages in the immunoadjuvant action of liposomes: effects of elimination of splenic macrophages on the immune response against intravenously injected liposome-associated albumin antigen. *Immunology* 66: 466.

Tainer, J.A., Getzoff, E.D., Paterson, Y., Olson, A.J. and Lerner, R.A. 1985. The atomic mobility component of protein antigenicity. *Annu. Rev. Immunol.* 3:501-535.

Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 76: 4350-4354

Turnbull, J.F. 1993. "Epitheliocystis and Salmonid Rickettsial Septicaemia". En **Bacterial Diseases of Fish** (Inglis, V., Roberts, R.J. & Bromage, N.R. Eds.). Blackwell Scientific Publications, Oxford, Reino Unido. pp. 3-22

Wada, S., Hatai, K. & Shimotsu, T. 1995. A disease with liver swelling and nodule formation in cultured Tilapia. 1995 Spring Meeting Jap. Soc. Fish Pathol., Tokyo (abstract en japonés).

Westphal, O. & Jann, K. 1965. Bacterial lipopolysaccharides. **Methods Carbohydrate Chem.** 5: 83.

Wong, J.P., Cherwonogrodzky, J.W., Di Ninno, V. L., Stadnyk, L.L. & Knodel, M.H. 1992. Liposome potentiation of humoral response to lipopolysaccharide and O-polysaccharide antigens of *Brucella abortus*. **Immunology** 77:123

ANEXO 1

“DESCRIPCION DE LA PATOLOGIA”

PROYECTO FIP 95 - 34

“Estudio Inmunológico de *Piscirickettsia salmonis*”

“Descripción de la patología”

Piscirickettsiosis

1. Patología
 - 1.a. Lesiones macroscópicas
 - 1.b. Histopatología
 - 1.c. Hematología

2. Diagnóstico

3. Agente causal
 - 3.a. Morfología
 - 3.b. Características de cultivo
 - 3.c. Taxonomía
 - 3.d. Serología

4. Epizootiología
 - 4.a. Especies susceptibles
 - 4.b. Distribución geográfica
 - 4.c. Modo de transmisión
 - 4.d. Factores desencadenantes

5. Patogenicidad y mecanismos de virulencia

6. Control y prevención de la enfermedad
 - 6.a. Quimioterapia
 - 6.b. Vacunación

1. Patología

1.a. Lesiones macroscópicas

Como en la mayoría de las enfermedades de peces, los signos clínicos varían según el brote y el individuo. Los peces muestran los signos clásicos de enfermedad, oscurecimiento de la piel, letargia y nadan en la superficie de los tanques cercanos a las esquinas. Las lesiones externas incluyen palidez de las branquias y lesiones y hemorragias en la piel. Internamente, los peces pueden tener evidencias de ascitis, peritonitis y palidez. El tracto gastrointestinal, la vejiga natatoria y las vísceras pueden presentar hemorragias petequiales. El bazo, el hígado y el riñón se ven hinchados y el hígado y el riñón están decolorados. Ocasionalmente, el hígado puede estar hemorrágico o presentar nódulos amarillos subcapsulares multifocales. En una pequeña proporción de peces enfermos terminales se ha descrito pericarditis (Turnbull, 1993).

1.b. Histopatología

La histopatología asociada a la infección con *P. salmonis* ha sido descrita por varios autores (Branson y Nieto, 1991; Cvitanich y col, 1991; Brocklebank y col, 1993; Turnbull, 1993).

Se pueden observar organismos rickettsiales pleomórficos dentro de vacuolas citoplasmáticas, libres en el citoplasma o extracelularmente, en la mayoría de los tejidos del cuerpo. Rickettsias son observadas comúnmente dentro de macrófagos.

Hay necrosis y edema en los tejidos hematopoyéticos con una respuesta granulomatosa. Es característica la coagulación intravascular diseminada con necrosis del endotelio vascular, también se puede observar inflamación celular perivascular. Estos cambios vasculares, que pueden aparecer en todos los tejidos, son similares a aquellos observados en otras especies animales afectadas por organismos rickettsiales.

El hígado puede sufrir necrosis focal a difusa. El riñón y el bazo presentan patología vascular y hematopoyética generalizada.

En la piel se pueden observar varios grados de necrosis de la epidermis, la dermis y la musculatura asociada. La respuesta celular inflamatoria puede diseminarse a lo largo del septum intramuscular.

En algunos peces se pueden observar células grandes (10x 20 μ m) en el tejido hematopoyético (Branson y Díaz-Muñoz, 1991). Estas células presentan un gran núcleo con muy poco citoplasma. El origen y función de estas células es desconocido.

1.c. Hematología

La palidez de los peces infectados es un reflejo del bajo hematocrito que de un valor normal de 35-50%, puede bajar del 35% al 2%. Se ha observado neutrofilia (Branson y Díaz-Muñoz, 1991) y un aumento de los macrófagos circulantes que contienen rickettsias o restos celulares (Cvitanich et al, 1991).

Estos signos clínicos e histológicos se han observado en ausencia de pérdidas significativas, lo que sugiere que *P. salmonis* requiere algunos factores adicionales para producir mortalidades (Brocklebank y col, 1993).

2. Diagnóstico

El diagnóstico del SRS se basa en la observación de los signos clínicos antes mencionados y fundamentalmente de la observación de frotis de tejidos, que evidencien la presencia de bacterias rickettsiales, mediante las tinciones Gram, Giemsa, Azul de metileno o Naranja de Acridina. La detección de rickettsias mediante estas tinciones,

especialmente las tres primeras, es dificultosa cuando la concentración de bacterias en el tejido es baja (Garcés y col, 1991). La tinción con naranja de acridina produce un mejor contraste entre el tejido y las bacterias pero no es específica, ya que todas las bacterias pueden teñirse con esta técnica.

Lannan y Fryer (1991) sugirieron que el aislamiento en cultivos de células y la observación microscópica de frotis de tejidos teñidos con Naranja de Acridina son los métodos recomendados para la detección e identificación presuntiva de *P.salmonis*. Pero indican que la identificación confirmatoria debe ser realizada utilizando métodos serológicos como la Técnica de Inmunofluorescencia Indirecta (IFAT) o la técnica de Western Blot.

La metodología y resultados del ensayo IFAT para la detección de *P. salmonis* han sido descritos detalladamente (Lannan et al, 1991) y se ha señalado como un método simple, rápido y sensible para la diagnosis de esta enfermedad, siendo actualmente el método de elección para el diagnóstico confirmativo de la enfermedad. Alternativamente, se ha descrito un método relativamente rápido para la identificación de *P.salmonis*, utilizando técnicas inmunohistoquímicas en muestras fijadas en formalina (Alday-Sanz et al, 1994).

Recientemente, Maucl y colaboradores (1996) han desarrollado la técnica de PCR para la detección del ADN de *P. salmonis* en cultivos de células de peces y tejidos infectados de pez. La sensibilidad de este ensayo permite la identificación del agente infeccioso más allá del límite de detección de la examinación microscópica.

3. El agente causal

3.a. Morfología

El agente causal, *P. salmonis*, es una bacteria pleomórfica, predominantemente cocoide pero también puede verse como anillos o pares de bacilos curvos; es inmóvil y variable en tamaño (su diámetro puede oscilar entre 0,5 μm hasta más de 2 μm). En frotis o improntes de tejidos muy infectados teñidos con Gram o Giemsa, las bacterias se ven solas, en pares, pequeños o grandes grupos tanto intracelular como extracelularmente (Cvitanich et al, 1990; Fryer et al, 1990).

La microscopía electrónica de transmisión revela bacterias en pares o solas que generalmente se desarrollan dentro de vacuolas citoplasmáticas, puede existir más de una inclusión por célula y el número de bacterias por inclusión varía. La ultraestructura de los microorganismos es la típica de una bacteria gram-negativa. Cada microorganismo presenta dos membranas: una membrana externa ondulada y una membrana interna. La apariencia rizada o plegada de la envoltura celular ha sido descrita por otros autores para otras especies de rickettsia (Turnbull, 1993). Cerca de la membrana plasmática se han observado áreas densas conteniendo estructuras tipo ribosomas. En la región central se observa material fibrilar tipo ADN y pequeñas vacuolas variables en tamaño y cantidad. Frecuentemente se pueden observar bacterias aparentemente en proceso de división binaria (Fryer et al, 1990).

El examen de células de cultivo infectadas mediante microscopía electrónica de barrido reveló, después de 24 h de incubación, la presencia de organismos cocoides irregulares fijados en la superficie de las células hospedadoras. Después de 8 días de incubación, los microorganismos se ven desparramándose desde las células infectadas rotas o libres en el espacio intracelular. En esta etapa los microorganismos presentan membranas externas muy plegadas y varían en tamaño y morfología (Fryer et al, 1990).

P. salmonis se tiñe positivamente con Giemsa, Azul de metileno y la Adaptación de Pinkerton de la tinción de Jiménez y es basófilica con Hematoxilina y Eosina. Es Gram negativa y no se tiñe con PAS, Jiménez, Zeil Neilson o Macchiavello (Turnbull, 1993).

3.b. Características de Cultivo

P. salmonis no es capaz de crecer en 41 medios de cultivo artificiales ensayados. Sin embargo, ha sido cultivada en varias líneas celulares de peces salmónidos y no salmónidos, como por ejemplo, CHSE-214, EPC, CHH-1, CHSE-119, TRG-2, y FHM (Cvitanich et al, 1991, Fryer et al 1990, 1992; Turnbull, 1993). Lannan y Fryer (1991) recomiendan el uso de la línea CHSE-214 para el crecimiento de *P. salmonis*.

Debido a que *P. salmonis* es sensible a bajas concentraciones de los quimioterápicos usados rutinariamente en cultivo celular, las células deben ser mantenidas en medio de crecimiento libre de antibióticos. El organismo es capaz de replicarse entre 10 y 21°C pero la temperatura óptima de crecimiento es entre 15 y 18 °C. No hay crecimiento a 25°C y éste se retarda arriba de 20°C y bajo 10°C.

El agente rickettsial se aísla generalmente a partir del riñón, utilizando las técnicas para el aislamiento de virus (Fryer et al, 1990). Una porción de riñón de un pez enfermo es removida asépticamente y mantenida a 4 °C, sin congelar, pues el microorganismo parece ser sensible a los extremos de temperatura. El tejido se homogeniza en un recipiente estéril y se diluye en un tampón sin antibióticos. Para evitar la toxicidad asociada con las preparaciones concentradas es necesario diluir el homogenado (1/100, 1/1000) antes de su inoculación en las células. Los cultivos inoculados se incuban a 15-18°C y se observan diariamente hasta la aparición de efecto citopático (CPE). El aislamiento primario puede tardar más de 21 días y el CPE característico consiste en agrupamientos de células que tienden a redondearse y que contienen grandes vacuolas. En los subcultivos siguientes, el CPE aparece entre 4 a 7 días después de la inoculación.

P. salmonis produce títulos de 10^6 a 10^7 TCDI₅₀ por ml en líneas celulares de cultivo. El título puede reducirse más de un 99% por un ciclo de congelación-descongelación (-70°C), la adición de un 10% de dimetilsulfóxido o glicerol en el medio de congelamiento tiene un efecto criopreservador.

No existen datos sobre los requerimientos nutricionales del patógeno.

3.c. Taxonomía

Fryer y col (1992) en base a el análisis del ARNr, las características morfológicas, a la temperatura de crecimiento, al rango de hospedador y las características serológicas han propuesto un nuevo género y una nueva especie de la Familia *Rickettsiaceae* y del orden *Rickettsiales* y proponen el nombre específico *Piscirickettsia salmonis* para el microorganismo. Estudios preliminares indican que no pertenece a la tribu *Rickettsieae* y sugieren que podría pertenecer a la tribu *Ehrlichieae*, en base su morfología y lugar de replicación.

La cepa tipo de la especie LF-89 ha sido depositada en la Colección Americana de Cultivos Tipo como la cepa ATCC(R) VR 1361 y es el primer aislado de *P. salmonis* que fue descrito (Fryer et al, 1990).

3.d. Serología

P. salmonis no reacciona con un anticuerpo monoclonal específico dirigido contra el lipopolisacárido del género *Chlamydia* (Fryer et al, 1990; Cvitanich et al, 1991), lo que indica que este microorganismo no pertenece a dicho género.

Recientemente, se ha publicado el único estudio (Kuzyk y col, 1996) en relación a las características inmunológicas de la especie *P. salmonis*. Estos autores han indicado que los antígenos inmunoreactivos de *P. salmonis* identificados por el antisuero de conejo son antígenos de superficie y difieren significativamente de aquellos

identificados por el suero de peces convalescientes, más aún, *P. salmonis* indujo una baja respuesta humoral en peces, indicando que la activación de la inmunidad innata y mediada por células puede ser mecanismos de defensa más importantes en el control de esta enfermedad.

No se han realizado estudios encaminados a establecer las características serológicas de la especie, ni su relación antigénica con otras especies relacionadas.

4. Epizootiología

4.a. Hospedadores susceptibles

Inicialmente se pensó que la enfermedad solamente afectaba al Salmón coho (Bravo y Campos, 1989), sin embargo, desde 1990, la Piscirickettsiosis ha sido detectada en otras especies de salmónidos, Salmon coho (*O. Kisutch*), Salmón del Atlántico (*Salmo salar*), Salmon chinook (*O. tshawytscha*), Salmon sakura (*O. masou*) y trucha arcoiris (*O. mykiss*) (Cvitanich y col, 1991; Brocklebank y col, 1993; Rodger y Drinan, 1993, Bravo, 1994). *P. salmonis* afecta a todos los peces salmónidos cultivados en Chile.

En los últimos años se han aislado microorganismos tipo rickettsia a partir de varias especies de Tilapia (*Oreochromis y Tilapia* sp.) (Chern y Chao, 1994; Wada y col, 1995) y a partir de otras especies de peces (Khoo y col, 1995; Comps y col, 1996), sin embargo, no se ha demostrado que estos aislados pertenezcan a la especie *P. salmonis*.

4.b. Distribución geográfica

En un comienzo la enfermedad estuvo restringida al sur de Chile, específicamente a las pisciculturas que se encuentran en la Isla de Chiloé y en las cercanías de Puerto Montt, en las fases de cultivo en agua de mar. Sin embargo, desde 1992 se han descrito patologías similares en peces asociadas a organismos rickettsiales en Canadá (Evelyn, 1992, Brocklebank y col, 1993), Noruega (Olsen y col, 1993), Irlanda (Rodger y Drinan,

1993), Taiwan (Chern y Chao, 1995), Japón (Wada y col, 1996), Colombia (Khoo y col, 1995) y Francia (Comps, 1996). Solamente en Chile la patología ha tenido una incidencia grave en la producción.

Es importante establecer metodologías que puedan diferenciar *P.salmonis* de otros organismos rickettsiales patógenos de peces, para poder esclarecer aspectos de la biología y epidemiología de *P.salmonis*, indispensables para controlar y prevenir nuevas epizootias tanto en Chile como en otros países.

4.c. Modo de transmisión

La presencia de un vector en la mayoría de las enfermedades causadas por rickettsias en mamíferos sugiere que un vector podría estar involucrado en la Piscirickettsiosis. Los artrópodos terrestres son conocidos reservorios y vectores de rickettsias, por esto se sospecha que artrópodos marinos, como varias especies de *Caligus* o *Lepeophtheirus* podrían transferir la enfermedad de un pez a otro, sin embargo, se ha demostrado la transmisión horizontal de *P. salmonis*, sin la mediación aparente de un vector parásito, tanto en agua dulce como en agua de mar (Cvitanich y col, 1991). Además, tales parásitos no se han observado en todos los brotes de Piscirickettsiosis (Bravo, 1994; Brockleblank y col, 1993). Es probable que las rickettsias patógenas de animales acuáticos no necesiten un vector, la transmisión horizontal a través del agua podría jugar un papel importante en la diseminación de la enfermedad.

El primer requisito para que exista transmisión a través del agua es que el agente patógeno sobreviva en el medio acuático, en base a esto, Lannan y Fryer (1994) realizaron una serie de experimentos para determinar el tiempo de sobrevivencia de *P. salmonis* extracelularmente, bajo variadas condiciones ambientales. Estos autores indican que *P. salmonis* sobrevive extracelularmente un tiempo considerable (aproximadamente 10 días) en agua de mar y se inactiva al ser incubada en agua dulce,

lo que posibilita la transmisión directa en el medio marino y la limita su ocurrencia en agua dulce, esto puede explicar la baja incidencia de Piscirickettsiosis en lugares de agua dulce.

Aunque la mayor parte de las epizootias atribuidas a *P. salmonis* han ocurrido en el mar, aproximadamente 6 a 12 semanas después de que los peces han sido transferidos a agua de mar (Fryer y col, 1992), existen al menos dos reportes de la enfermedad en agua dulce en el sur de Chile. Bravo en 1994 describió un brote de Piscirickettsiosis en el Lago Llanquihue, que afectó a un stock de trucha arcoiris que se había mantenido siempre en agua dulce y cuyas ovas habían sido importadas desde Estados Unidos. Posteriormente, Gaggero y colaboradores (1995) registraron el aislamiento de *P. salmonis* a partir salmon coho, salmon del Atlántico y trucha arcoiris durante la fase de cultivo en agua dulce. La enfermedad ha sido reproducida experimentalmente en agua dulce por Garcés y colaboradores (1991) pero no pudieron demostrar su transmisión horizontal en este medio, lo que se contrapone con lo encontrado por otros autores (Cvitanich y col, 1991).

El patógeno ha sido encontrado en las gónadas de peces inmaduros y en el fluido ovárico de individuos maduros lo cual sugiere la posibilidad de transmisión vertical (Cvitanich y col, 1991; Brockleblank y col, 1993). Bustos y colaboradores (1994) realizaron una experiencia de transmisión vertical siguiendo la progenie de dos hembras, una positiva y otra negativa para SRS. *P. salmonis* fue detectada mediante IFAT en el 98,3% de la progenie de la hembra infectada, en contraste, solo se detectó en el 26,7% de la progenie del reproductor negativo para SRS. En ambos casos no se observaron signos clínicos de la enfermedad, ni se aisló el agente causal, debido a que la experiencia no pudo seguir su curso normal. Es necesaria más evidencia experimental que apoye la transmisión vertical de *P. salmonis*. En Chile, para prevenir la transmisión vertical, los reproductores son rutinariamente examinados mediante la Tinción Gram para descartar los portadores de SRS y las ovas son desinfectadas con iodoforos (Cvitanich y col, 1991). Hay que destacar que la detección de *P. salmonis* mediante la Tinción Gram, no es la técnica de elección, especialmente cuando el nivel de detección

necesario es alto. Técnicas con mayor sensibilidad y especificidad deben implementarse con el fin de pesquisar posibles portadores asintomáticos, en los cuales la cantidad de microorganismos no es detectable mediante las técnicas recomendadas (Lannan y Fryer, 1991). Recientemente, se ha publicado el desarrollo de un ensayo basado en la Reacción de la Polimerasa en Cadena (PCR) que permite la detección temprana de la infección por *P. salmonis* cuando la cantidad de bacterias en el tejido es baja (Mauel y col, 1996).

Los reservorios naturales de *P. salmonis* son desconocidos. Estos podrían ser peces no salmónidos salvajes que se mueven libremente a través de las balsas-jaula u otras formas marinas. Se han descrito infecciones rickettsiales en moluscos y crustáceos del Pacífico (Figueras, 1991). En estudios preliminares se han detectado, mediante IFAT e histopatología, organismos rickettsiales en *Ceratothoa gaudichaudii*, un parásito hematófago de salmónidos, sin embargo, el número de especímenes muestreados no fue significativo. De 120 especímenes de peces salvajes recolectados desde jaulas positivas para SRS, ninguna muestra dio positivo para *P. salmonis* (Garces y col, 1994).

4.d. Factores desencadenantes de la enfermedad

Las epizootias chilenas comienzan generalmente después de periodos de estres ambiental, como temperaturas fluctuantes, blooms de algas no tóxicos y tormentas fuertes. Se ha sugerido que una nutrición inadecuada o el estres severo son posibles desencadenantes de la patología (Branson y Nieto, 1991).

Las mortalidades ocurren en otoño y mediados del invierno (Abril a agosto), cuando la temperatura del agua oscila entre 9 y 16°C y generalmente decrecen a fines del invierno. Se producen infecciones recurrentes en primavera, de octubre a diciembre (Cvitanich y col, 1991).

La aparición estacional y la asociación temporal de la patología con el estres ambiental han sido observados también en Canadá (Brockleblank y col, 1993), pero al

contrario de lo que sucede en Chile, la mortalidad asociada fue mínima y no se produjeron brotes recurrentes.

Se piensa que aún siendo *P.salmonis* el agente causal de la SRS existirían otros factores que precipitan las masivas mortalidades observadas en los cultivos del sur de Chile.

5. Patogenicidad y Mecanismos de Virulencia

P. salmonis ha sido detectada en todas las especies de salmónidos cultivadas en Chile, sin embargo, la especie más susceptible es al salmon coho, en cuales cultivos las mortalidades pueden alcanzar el 90% (Bravo y Campos, 1989). Las granjas con peces infectados han reportado mortalidades mensuales del orden del 1 al 20% y más del 40% durante las epizootias (Cvitanich y col, 1991). Por el contrario, la mortalidad observada en un brote natural de Piscirickettsiosis en Canadá fue del 8% para el salmón del Atlántico e insignificante para el salmon chinook (Brockleblank y col, 1993).

El primer aislado de *P. salmonis* (LF-89), que representa la cepa tipo de la especie, fue inoculado vía intraperitoneal en peces juveniles de salmón coho y del Atlántico para probar su virulencia y completar los postulados de Koch (Garcés y col, 1991). La mortalidad osciló entre el 88 al 100% en todos los grupos inyectados y siguió un claro patrón dosis-respuesta. La sintomatología de la enfermedad se observó solamente en los ejemplares de salmon coho pero el microorganismo fue reaislado en cultivo puro a partir de los peces moribundos de ambas especies.

Una experiencia similar realizaron Cvitanich y colaboradores (1991), quienes reprodujeron la patología en salmón coho tanto en agua de mar como agua dulce, sin embargo, en este estudio no se mencionan los porcentajes de mortalidad ni su relación con la dosis de microorganismos inyectada.

Brockleblank y colaboradores (1993) inyectaron tejidos homogenizados de salmones afectados por una septicemia rickettsial, en smolts de salmon chinook. Los peces inoculados desarrollaron la enfermedad y se recuperó el agente causal a partir de estos. Las mortalidades alcanzaron el 50-88% .

No existen datos de ensayos de patogenicidad utilizando otras vías de infección aparte de la inyección intraperitoneal.

Los mecanismos de virulencia que posee *P. salmonis* no han sido estudiados, sin duda, la sobrevivencia intracelular de esta bacteria juega un papel preponderante en la patogénesis de la enfermedad. Sería interesante profundizar en los mecanismos involucrados en esta capacidad de *P. salmonis*.

6. Control y Prevención de la enfermedad

6.a. Quimioterapia

Una gran variedad de antibióticos han sido utilizados como terapia de la Piscirickettsiosis, sin embargo, estos tratamientos no han sido efectivos en el control de la enfermedad (Branson y Díaz-Muñoz, 1991; Cvitanich y col, 1991). Los agentes antimicrobianos más utilizados contra la enfermedad han sido oxitetraciclina, ácido oxolínico, Florfenicol y Flumequina (E. Madrid, comunicación personal).

Los métodos de laboratorio estándar para determinar la sensibilidad a antibióticos no son aplicables a *P. salmonis* debido a su naturaleza intracelular, por ello, la sensibilidad antimicrobiana de esta bacteria ha sido determinada usando líneas celulares (Fryer y col, 1990; Cvitanich y col, 1991; Fryer y col, 1992; Smith y col, 1996). *P. salmonis* es sensible *in vitro* a una gran cantidad de antibióticos (Fryer y col, 1992; Smith y col, 1996).

Smith y colaboradores (1996) determinaron la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) de diferentes aislados de *P. salmonis* ante cinco agentes antimicrobianos y encontraron dramáticas variaciones en el patrón de sensibilidad entre las cepas estudiadas. Estos resultados podrían explicar las inconsistencias observadas en los tratamientos quimioterápicos usados en terreno e indican que no hay un agente antimicrobiano que pueda ser recomendado en todos los brotes de Piscirickettsiosis.

La estandarización de los ensayos de sensibilidad a los quimioterápicos, para establecer patrones de sensibilidad, así como el estudio de los mecanismos que median la resistencia observada en *P. salmonis* a los agentes antimicrobianos, serán de gran utilidad para el desarrollo de mejores estrategias terapéuticas contra la enfermedad.

6.b. Vacunación

Debido a que la Piscirickettsiosis no es controlada satisfactoriamente por los quimioterápicos utilizados en acuicultura, el desarrollo de vacunas para prevenir la enfermedad debe ser considerado como un objetivo primordial en las investigaciones. Los esfuerzos deben dirigirse a la formulación de vacunas que demuestren una efectiva protección y con una relación costo beneficio adecuada.

Recientemente se ha publicado un trabajo (Smith y col, 1995) que describe la evaluación de bacterinas de *P. salmonis*. En la experiencia presmolts de salmon coho fueron vacunados intraperitonealmente y posteriormente, transferidos a un sitio de agua de mar con un historial de Piscirickettsiosis endémica, para ser desafiados naturalmente. Los peces vacunados con la bacterina no concentrada, experimentaron una mortalidad acumulativa significativamente más baja que el grupo control. Los peces vacunados con el antígeno concentrado mostraron una mortalidad ligeramente más alta que el grupo control. Aunque estos resultados sugieren un efecto inmunoprotector de la bacterina no

concentrada, la mortalidad del grupo control fue baja (aproximadamente 13%) lo que indica que el desafío no fue lo suficientemente exigente.

Estos autores han realizado otros ensayos de inmunoprotección variando algunas condiciones de las experiencias (Smith y col, 1996), sin embargo, en todos los casos los resultados han sido inconsistentes.

Esta claro que la formulación de una vacuna efectiva contra la Picirickettsiosis requiere de más investigación, es fundamental analizar las características antigénicas e inmunológicas de diferentes aislados de *P. salmonis*, así como la respuesta inmune de los hospedadores susceptibles. En éste contexto y a nuestro juicio, existen una serie de ventajas comparativas del agente que idealmente podrían facilitar su potencial manejo profiláctico. Ellas son:

- "*In vivo*", el agente está asociado a membranas de células infectadas, lo que facilita su purificación.
- Tiene una gran capacidad replicativa, lo que favorece una eficiente recuperación por unidad de masa de tejido infectado, o bien de cultivos "*in vitro*".
- Genera muchos organismos por célula, lo que favorece los estudios comparativos entre aislados y permite estimar su incidencia entre las tres diferentes especies de peces afectados.
- Cumple con los postulados de Koch, lo que potencia estudios sobre estabilidad genética.
- Tiene una capacidad infectiva sostenida en el tiempo, lo que favorece el diseño de estrategias preventivas.

Un resumen de los aspectos funcionales más relevantes de la patología de la *Piscirickettsia salmonis* serían los siguientes:

- Es un NUEVO agente, de reciente descripción y clasificación sistemática.
- Se desconoce su ciclo biológico e infectivo, información indispensable para enfrentar su control.
- Induce altas mortalidades, lo que hace aún más peligroso su efecto en el tiempo.
- Es un parásito intracelular obligado, lo que dificulta la aplicación de métodos clásicos de control.
- Es epizootico en salmónidos, lo que indica que aparentemente no debieran existir especies resistentes.
- Se multiplica intracelularmente en vacuolas citoplasmáticas, lo que facilita su enmascaramiento y por ende, potencia su persistencia.
- Ataca al pez en forma sistémica, lo que indica que aparentemente no es sólo uno el tejido u órgano blanco preferencial

ANEXO 2

“T A B L A S ”

PROYECTO FIP 95 - 34

“Estudio Inmunológico de *Piscirickettsia salmonis*”

Tabla 1.- Resumen de muestras obtenidas y procesadas de órganos y sangre de especímenes sanos y enfermos al día de hoy (28/02/96)

| ESPECIE | NUMERO | ESTADO PATOLOGICO |
|----------------------------|--------|-------------------|
| <i>O. mykiss</i> (81) | 52 | ENFERMOS |
| | 29 | SANOS |
| <i>O. Kisutch</i> (114) | 56 | ENFERMOS |
| | 69 | SANOS* |
| <i>S. Salar</i> (34) | 39 | ENFERMOS |
| | 27 | SANOS |

Total: 272 muestras a la fecha, de 225 muestras propuestas para todo el proyecto.

* Reproductores

Tabla 2.- Protocolo de inmunización para la obtención de anticuerpos policlonales mono-específicos.

| | Cond \ día | 0 | 6 | 7 | 14 | 21 |
|------------------|------------|-----|---------|-----|-----|-----|
| S2 (x1) | Ag (ug/ul) | 0,5 | | 0,5 | 0,5 | 0,5 |
| | Prot (ug) | 15 | | 20 | 20 | 12 |
| | Ag (ul) | 30 | 500 ul | 40 | 50 | 24 |
| | PBS (ul) | 50 | Pristán | 40 | 30 | 56 |
| | Ady. (ul) | 720 | | 720 | 720 | 720 |
| T6 (X2) | Ag (ug/ul) | 1 | | 1 | 1 | 1 |
| | Prot (ug) | 50 | | 50 | 50 | 50 |
| | Ag (ul) | 50 | 500 ul | 50 | 50 | 50 |
| | PBS (ul) | 30 | Pristán | 30 | 30 | 30 |
| | Ady. (ul) | 720 | | 720 | 720 | 720 |
| CE 3 (x2) | Ag (ug/ul) | 3,8 | | 3,8 | 3,8 | 3,8 |
| | Prot (ug) | 50 | | 50 | 50 | 50 |
| | Ag (ul) | 14 | 500 ul | 14 | 14 | 14 |
| | PBS (ul) | 66 | Pristán | 66 | 66 | 66 |
| | Ady. (ul) | 720 | | 720 | 720 | 720 |
| EM90 (X2) | Ag (ug/ul) | 1 | | 2 | 2 | 2 |
| | Prot (ug) | 50 | | 50 | 50 | 50 |
| | Ag (ul) | 50 | 500 ul | 25 | 25 | 25 |
| | PBS (ul) | 30 | Pristán | 55 | 55 | 55 |
| | Ady. (ul) | 720 | | 720 | 720 | 720 |
| Control (x2). | PBS (ul) | 80 | 500 ul | 80 | 80 | 80 |
| | Ady. (ul) | 720 | Ady. | 720 | 720 | 720 |

- Ag = Antígeno (Extracto purificado de P. salmonis)
 Prot = Concentración de proteína utilizada en cada fracción
 Ag = Volumen inyectado
 PBS = Volumen de buffer
 Ady = Volumen de adyuvante de Freund
 S2 = Muestra de Salmón del Atlántico enfermo
 T6 = Muestra de Trucha enferma
 CE3 = Muestra de Salmón coho enfermo
 EM90 = Cepa de Referencia de P. salmonis (Control Positivo)

Tabla 3.- Resumen de los resultados obtenidos en el ensayo Dot Blot con los anticuerpos policlonales mono-específicos.

| Anticuerpo mono-específico | Reconoce su antígeno | Reacción cruzada con |
|----------------------------|----------------------|----------------------|
| anti: | | |
| Control | No | T6 |
| S2 | +/- | - |
| T6 | Sí | CE 3 |
| EM-90 | Sí | CE 3; T6 |
| CE 3 | Sí | T6 |

Control = Albúmina Sérica Bovina
 S2 = Interfase de tejidos de Salmón del Atlántico enfermo
 T6 = Interfase de tejidos de Trucha arcoiris enferma
 CE 3 = Interfase de tejidos de Salmón coho enfermo
 (+/-) = Reacción débil

Tabla 4.- Cuantificación proteica de muestras de tejidos durante los pasos del tratamiento con Triron X-114

| <i>Muestra</i> | <i>V muestra</i> | <i>V agua</i> | <i>V final</i> | <i>Absorvancia</i> | <i>Prot (ug/ul)</i> |
|----------------|------------------|---------------|----------------|--------------------|---------------------|
| CE 13 P1 | 10 | 90 | 100 | 0,071 | 0,70 |
| CE 13 P2 | 10 | 90 | 100 | 0,034 | 0,40 |
| CE 13 P3 | 10 | 90 | 100 | 0,294 | 2,85 |
| CE 13 S3 | 10 | 90 | 100 | 0,025 | 0,26 |
| CE 14 P1 | 10 | 90 | 100 | 0,018 | 0,19 |
| CE 14 P2 | 10 | 90 | 100 | 0,055 | 0,61 |
| CE 14 P3 | 10 | 90 | 100 | 0,614 | 5,90 |
| CM 17 P1 | 10 | 90 | 100 | 0,104 | 1,00 |
| CM 17 P2 | 10 | 90 | 100 | 0,074 | 0,6 |
| CM 17 P3 | 10 | 90 | 100 | 1,000 | 10 |
| CM 17 S3 | 100 | 0 | 100 | 0,381 | 3,6 |
| TC 7 P3 | 10 | 90 | 100 | 0,084 | 0,75 |
| RB 5 P3 | 10 | 90 | 100 | 0,418 | 4,0 |
| RB 5 S3 | 100 | 0 | 100 | 0,017 | 0,17 |

CE = Salmón coho enfermo
 CM = Salmón coho sano
 TC = Trucha arcoiris enferma
 RB = Trucha arcoiris sana

Tabla 5.- Concentración de Proteínas de 15 fracciones Séricas enriquecidas en IgM. Duplicadas desalinizadas en Sigma Filters y en columnas de Sephadex G-50.

| TIPO | CODIGO | NUMERO | VOLUMEN INICIAL (ml) | CONCENTRACION DE PROTEINAS (mg/ml) | |
|---------------|--------|--------|----------------------|------------------------------------|---------------|
| | | | | SIGMA FILTERS | SEPHADEX G-50 |
| coho enfermo | CE | 20 | 2 x 1 | 12,4 | 4,9 |
| | CE | 41 | 2 x 1 | 16,3 | 12,9 |
| | SALX | 2 | 2 X 1 | 19,5 | 24 |
| | SALX | 5 | 2 X 1 | 2,7 | 3,1 |
| | SALX | 7 | 2 X 1 | 4,9 | 7,3 |
| trucha enferm | T | 1 | 2 X 1 | 20,6 | 11,3 |
| | T | 4 | 2 X 1 | 4,3 | 2,9 |
| | T | 9 | 2 X 1 | 6,1 | 6,3 |
| trucha sana | TPC | 4 | 2 X 1 | 9,1 | 16,9 |
| | TPC | 5 | 2 X 1 | 23 | 9,8 |
| | TPC | 6 | 2 X 1 | 3,9 | 11,9 |
| | TPC | 8 | 2 X 1 | 6,4 | 7,8 |
| salar enfermo | SM | 1 | 2 X 1 | 12,4 | 6,9 |
| | SM | 4 | 2 X 1 | 4,2 | 1,5 |
| | SM | 5 | 2 X 1 | 4,2 | 10,2 |

Tabla 6.-

Concentración de Proteínas de 100 fracciones Séricas enriquecidas en IgM post-dealuminación con Sephadex G-50.

| Coho enfermo | alícuota ml | concentración g/l |
|--------------|-------------|-------------------|
| CE1 | 1,00 | 10,30 |
| CE2 | 1,00 | 5,70 |
| CE3 | 1,00 | 12,89 |
| CE4 | 1,00 | 15,00 |
| CE5 | 0,70 | 17,00 |
| CE6 | 0,80 | 17,10 |
| CE7 | 2,00 | 11,20 |
| CE8 | 0,80 | 12,50 |
| CE9 | 2,00 | 13,80 |
| CE10 | 2,00 | 11,50 |
| CE11 | 0,80 | 22,40 |
| CE12 | 0,70 | 20,30 |
| CE13 | 0,60 | 5,50 |
| CE14 | 0,75 | 10,60 |
| CE15 | 0,75 | 20,20 |
| CE18 | 0,80 | 11,80 |
| CE20 | 2,00 | 12,4 / 4,9 |
| CE22 | 0,80 | 23,70 |
| CE23 | 1,00 | 19,40 |
| CE24 | 0,80 | 23,70 |
| CE25 | 1,00 | 21,80 |
| CE28 | 1,00 | 17,80 |
| CE29 | 1,00 | 20,70 |
| CE30 | 1,00 | 16,40 |
| CE31 | 1,00 | 21,90 |
| CE32 | 1,00 | 18,90 |
| CE33 | 1,00 | 13,30 |
| CE34 | 1,00 | 22,70 |
| CE35 | 0,60 | 23,70 |
| CE36 | 1,00 | 11 |
| CE37 | 0,5 | 23,7 |
| CE38 | 0,60 | 19,30 |
| CE39 | 1,00 | 17,70 |
| CE41 | 2,00 | 16,3 / 12,9 |
| SALX2 | 2,00 | 19,5 / 24 |
| SALX5 | 2,00 | 2,7 / 3,1 |
| SALX7 | 2,00 | 4,9 / 7,3 |
| CC1 | 0,75 | 15,30 |
| CC3 | 1,00 | 16,20 |
| CC5 | 1,00 | 14,90 |
| CC6 | 1,00 | 13,70 |
| CC9 | 1,00 | 13,30 |
| <i>total</i> | 42 | |

| Coho sano | alícuota ml | concentración g/l |
|--------------|-------------|-------------------|
| BS1 | 0,85 | 23,7 |
| BS4 | 1,00 | 24 |
| BS8 | 1,00 | 23,7 |
| BS11 | 1,00 | 23,7 |
| AN3 | 1,00 | 23,7 |
| AN4 | 1,00 | 23,7 |
| AN6 | 1,00 | 23,7 |
| AN8 | 1,00 | 25,4 |
| CC1* | 0,40 | 23,7 |
| CC2* | 0,40 | 21,7 |
| <i>total</i> | 10 | |

Tabla 6.- Continuación

| Trucha enferma | alícuota ml | concentración g/l |
|----------------|----------------|----------------------|
| T1 | 2,00 | 20,6 / 11,3 |
| T2 | 1,00 | 23,7 |
| T4 | 2,00 | 4,3 / 2,9 |
| T5 | 1,00 | 12,8 |
| T6 | 1,00 | 23,7 |
| T7 | 1,00 | 7,4 |
| T8 | 0,50 | 23,7 |
| T9 | 2,00 | 6,1 / 6,3 |
| T10 | 1,00 | 24,1 |
| | | |
| TA5 | 1,00 | 16,8 |
| TA6 | 1,00 | 17,6 |
| TA8 | 0,90 | 23,7 |
| TA11 | 1,00 | 15,3 |
| | | |
| <i>total</i> | <i>13</i> | |

| Trucha sana | alícuota ml | concentración g/l |
|--------------|----------------|----------------------|
| TPC4 | 2,00 | 9,1 / 16,9 |
| TPC5 | 2,00 | 23 / 9,8 |
| TPC6 | 2,00 | 3,9 / 11,9 |
| TPC8 | 2,00 | 6,4 / 7,8 |
| | | |
| <i>total</i> | <i>4</i> | |

| Salar enfermo | alícuota ml | concentración g/l |
|---------------|----------------|----------------------|
| SM1 | 2,00 | 12,4 / 6,9 |
| SM2 | 1,00 | 12,70 |
| SM3 | 2,00 | 6,6 / 9,6 |
| SM4 | 2,00 | 4,2 / 1,5 |
| SM5 | 2,00 | 4,2 / 10,2 |
| SM6 | 2,00 | 10,60 |
| SM7 | 2,00 | 25,70 |
| SM8 | 1,00 | 12,20 |
| SM9 | 2,00 | 9,30 |
| | | |
| S1 | 2,00 | 5,4 / 3,8 |
| S2 | 1,00 | 9,10 |
| S3 | 1,00 | 9,30 |
| S4 | 2,00 | 6,3 / 8,2 |
| S6 | 1,00 | 10,90 |
| S7 | 1,00 | 9,00 |
| S8 | 2,00 | 4,8 / 8,6 |
| S9 | 2,00 | 9,4 / 7 |
| S10 | 2,00 | 13,2 / 9,5 |
| | | |
| SM14 | 1,00 | 3,20 |
| | | |
| <i>total</i> | <i>19</i> | |

| Salar sano | alícuota ml | concentración g/l |
|--------------|----------------|----------------------|
| SALAR1 | 1,00 | 10,40 |
| SALAR2 | 1,00 | 15,70 |
| SALAR3 | 0,80 | 9,40 |
| SALAR4 | 1,00 | 17,20 |
| SALAR5 | 1,00 | 13,80 |
| SALAR6 | 2,00 | 9,2 / 8,7 |
| SALAR7 | 0,60 | 21,30 |
| SALAR8 | 1,00 | 13,50 |
| SALAR9 | 1,00 | 10,70 |
| SALAR10 | 1,00 | 11,60 |
| SALAR11 | 0,60 | 11,70 |
| SALAR12 | 1,00 | 10,50 |
| | | |
| <i>total</i> | <i>12</i> | |

ANEXO 3

“FIGURAS”

PROYECTO FIP 95 - 34

“Estudio Inmunológico de *Piscirickettsia salmonis*”

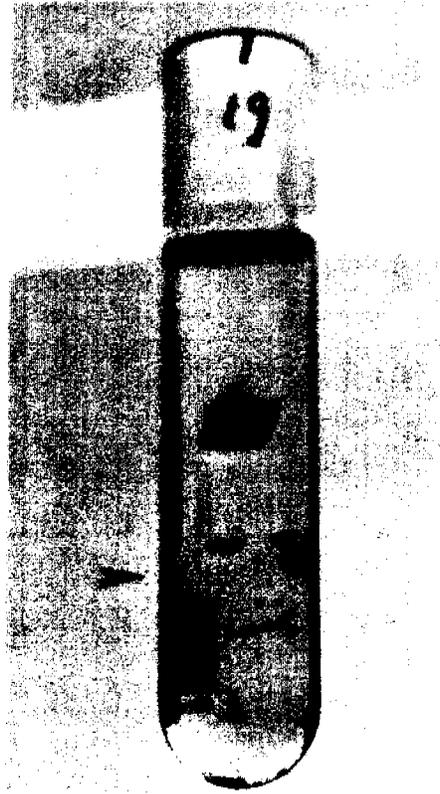
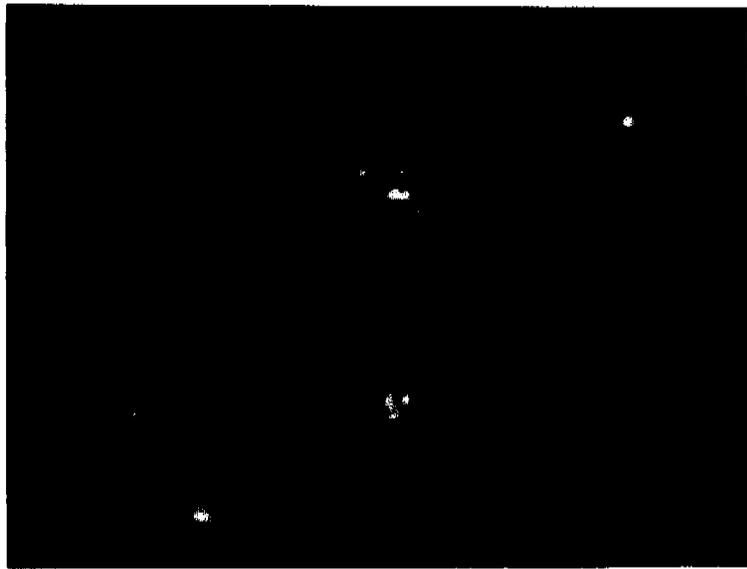
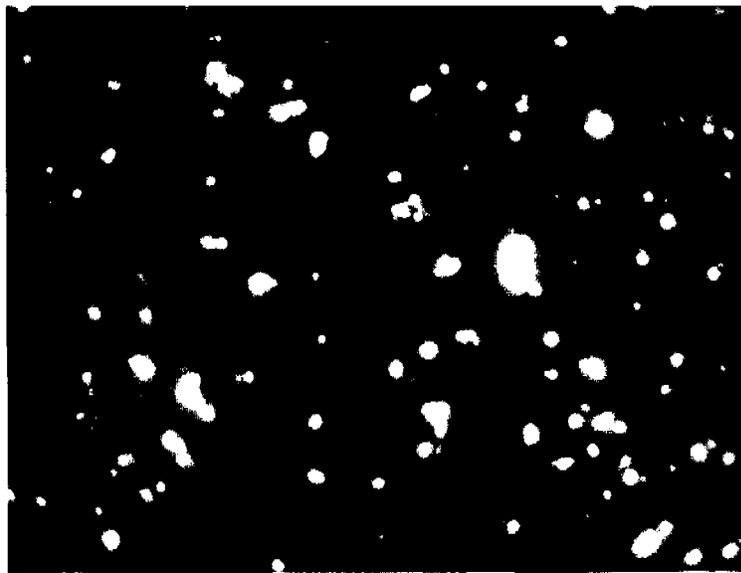


FIG 1. Gradiente discontinua de Rinografina 14-21-28 %. La flecha indica la interfase 21-28 %, que contiene las rickettsias



a



b

FIG 2 a. Frotis de interfase 21-28% de gradiente de Rinografina obtenida de tejidos de salmon coho, teñido con Naranja de Acridina

FIG 2 b. Frotis de sobrenadante de cultivo celular CHSE-214 infectado con la cepa tipo de *Piscirickettsia salmonis* EM-90, teñido con Naranja de Acridina

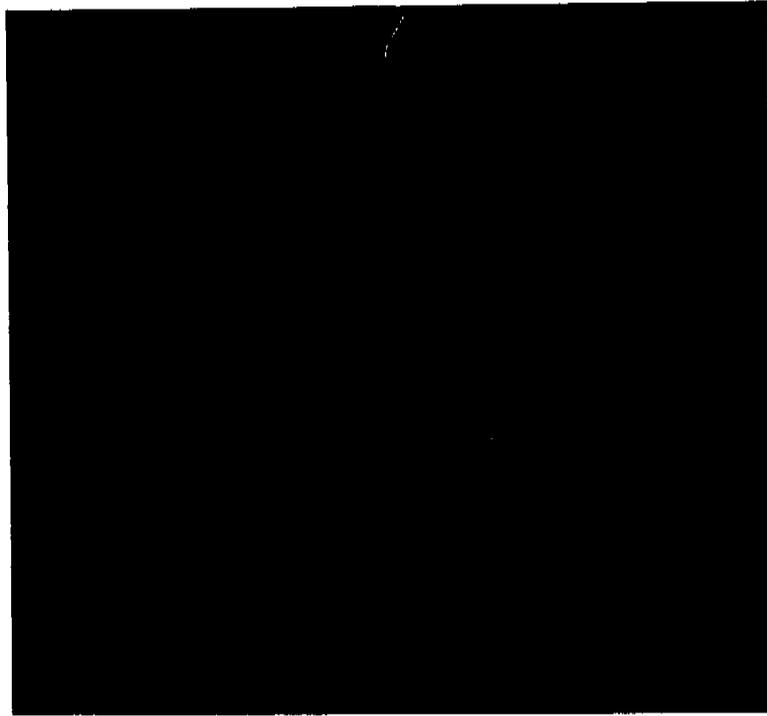


FIG 3. Inmunofluorescencia indirecta de frotis de interfase de 21-28 % de Rinografina utilizando como anticuerpo primario suero de conejo anti *P. salmonis*.

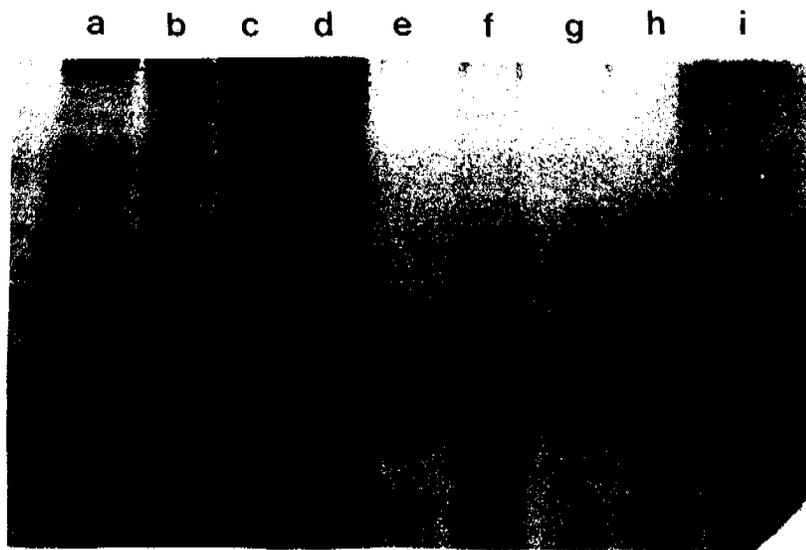


FIG 4. Perfil proteico comparativo de muestras de salmón coho, trucha arcoiris y control en un gel de poliacrilamida al 10 %. Tinción con Coomassie. **a:** *P. salmonis* EM-90; **b, c y d:** muestras de salmón coho; **e hasta i:** muestras de trucha arcoiris.

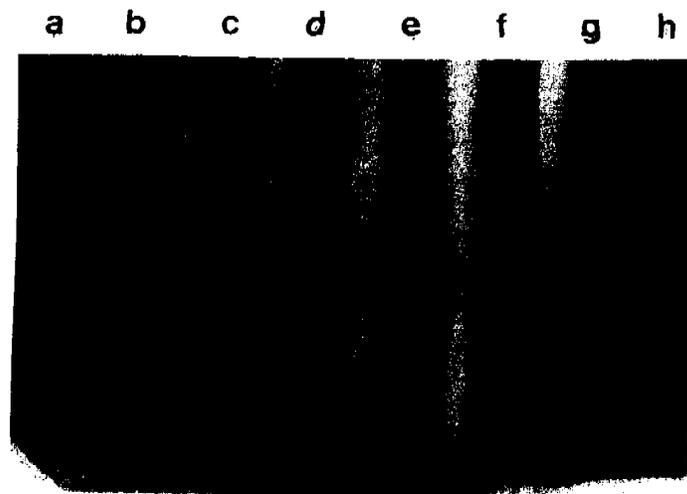


FIG 5. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 10 % de proteínas provenientes de muestras de peces enfermos. Tinción con Coomassie. **a:** marcador de peso molecular; **b:** control sano; **c, d, e:** salmón coho; **f, g y h:** trucha arcoiris.



FIG 6. Perfil proteico en minigel de poliacrilamida al 10 % de la cepa tipo de *P. salmonis* EM-90 crecida "in vitro". Tinción con Nitrato de plata. De izquierda a derecha, diferentes concentraciones de proteína: 0,25; 0,5; 1,0 y 2,0 ug por pocillo.

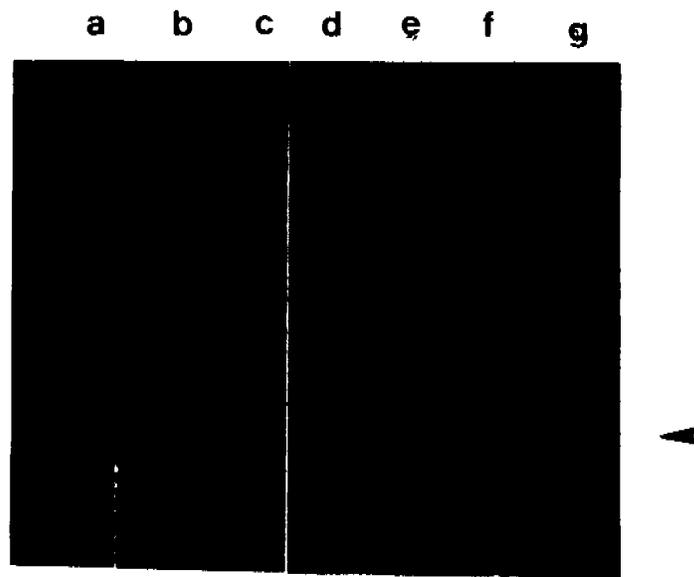


FIG 7. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12 % de muestras solubilizadas con Triton X-114 y teñidas con Nitrato de plata para lipopolisacáridos (LPS). **a:** salmón coho enfermo tratada con proteínas K; **b:** Control LPS *Salmonella minessota* R5; **c:** Control LPS *Escherichia coli*; **d:** *Piscirickettsia salmonis* EM-90 tratada con proteinasa K; **e:** *P. salmonis* EM-90; **f:** Salmón coho enfermo; **g:** marcador peso molecular proteínas, la flecha indica la banda de 14 Kd.

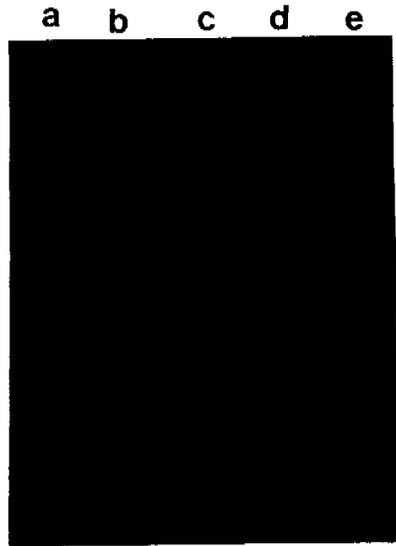


FIG 8. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% de muestras solubilizadas con Triton X-114 y teñidas con tinción de nitrato de plata para lipopolisacáridos. **a:** control LPS de *Escherichia coli*; **b:** control LPS *Salmonella minnesota R5*; **c:** *P. salmonis* EM-90 tratada con proteinasa K; **d:** trucha arcoiris enferma y **e:** salmón coho enfermo

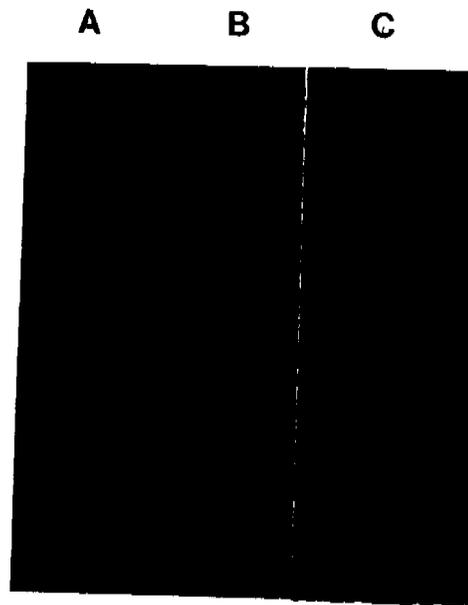
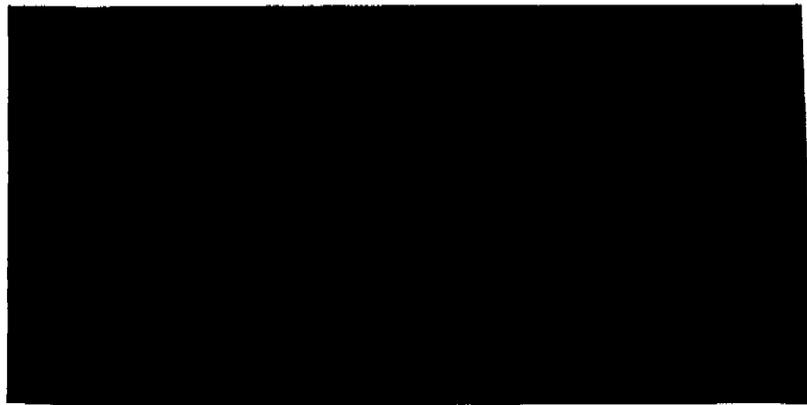


FIG 9. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 20 % de muestras solubilizadas con Triton X-114 y tratadas con proteinasa K. Tinción con Nitrato de plata para lipopolisacáridos (LPS). **A** y **B**: salmón coho enfermo; **C**: *P. salmonis* EM-90



FIG 10. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% de muestras solubilizadas con Triton X-114 y teñidas con tinción de nitrato de plata para lipopolisacáridos. **a:** Salmón salar enfermo; **b:** Salmón salar enfermo tratado con proteinasa K; **c:** *P. salmonis* EM-90 no solubilizada con Triton X-114; **d:** *P. salmonis* EM-90; **e:** *P. salmonis* EM-90 tratada con proteinasa K; **f:** Salmón coho enfermo tratado con proteinasa K; **g:** Salmón coho enfermo; **h:** Trucha enferma tratada con proteinasa K; **i:** Trucha enferma. Flecha indica proteína de peso molecular entre 30-40 Kd



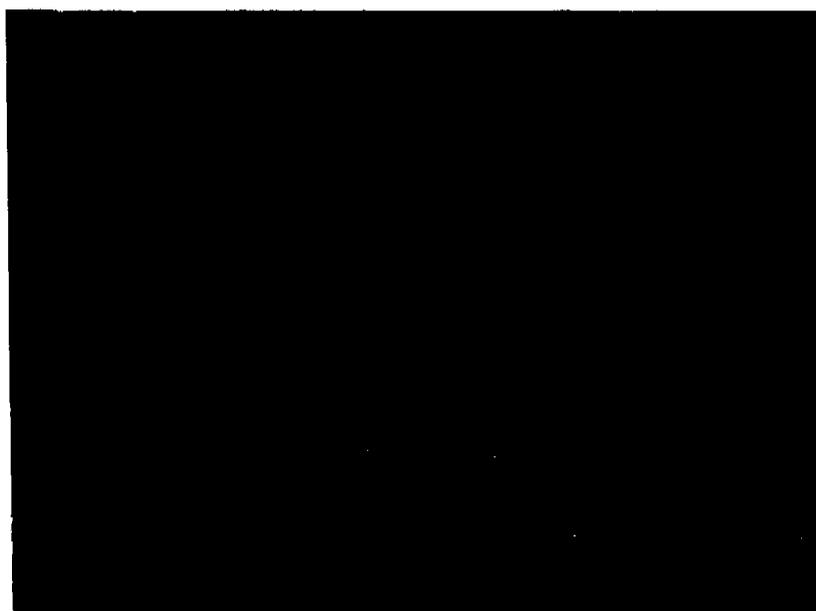
A

a b c d e f g h i j



B

FIG 11. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 10 % de interfases provenientes de tejidos infectados. **A:** Tratado con Con-FITC y **B:** inmunotincion con suero de conejo anti *P. salmonis*. **a, b** v **c:** muestras de salmon salar; **d:** EM-90; **e, f** v **g:** muestras de trucha arcoiris; **h, i** y **j:** muestras de salmon coho.



a b c d e f

FIG 12. Inmunotinción de muestras de peces tratadas con Triton X-114 y proteinasa K utilizando suero de conejo anti *Piscirickettsia salmonis*. **a:** salmón coho enfermo (P3); **b:** salmón coho enfermo (S3); **c:** trucha arcoiris sana (P3); **d:** Trucha arcoiris sana (S3); **e:** EM-90 (P3); **f:** EM-90 (S3).

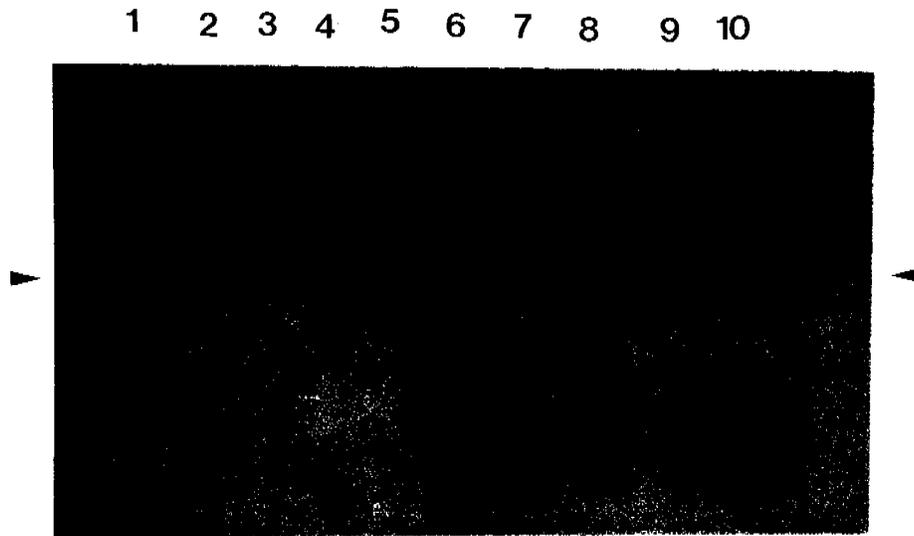


FIG 13. Western blot de muestras solubilizadas con Triton X-114 e incubadas con suero de conejo anti-*P. salmonis*. **1:** Marcador de LPS de *Salmonella minnesota*; **2:** Trucha arcoiris enferma; **3:** Trucha arcoiris enferma con proteinasa K; **6:** Control *P. salmonis* EM-90 con proteinasa K; **7:** Control *P. salmonis* EM-90; **8:** Control *P. salmonis* EM-90 a mayor concentracion **9:** Salmón salar enferma con proteinasa K; **10:** Salmón salar enfermo. Flecha muestra proteína inmunógena.

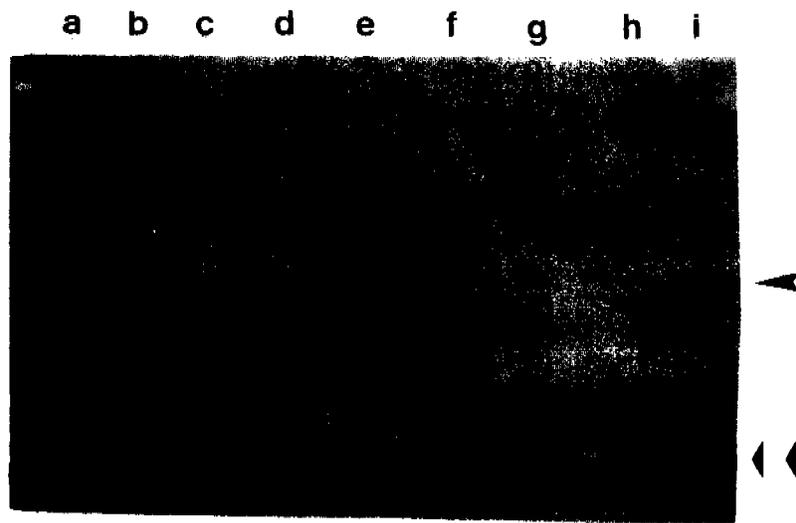


FIG 14. Western-Blot de muestras de interfase provenientes de tejidos de peces enfermos incubado con suero de conejo anti *Piscirickettsia salmonis*. **a, b y c:** salmón coho, **d, e y f:** trucha arcoiris; **g y h:** salmón salar; **i:** EM-90. **Flecha simple:** 50 Kd peso molecular; **flecha doble:** lipopolisacárido (LPS).

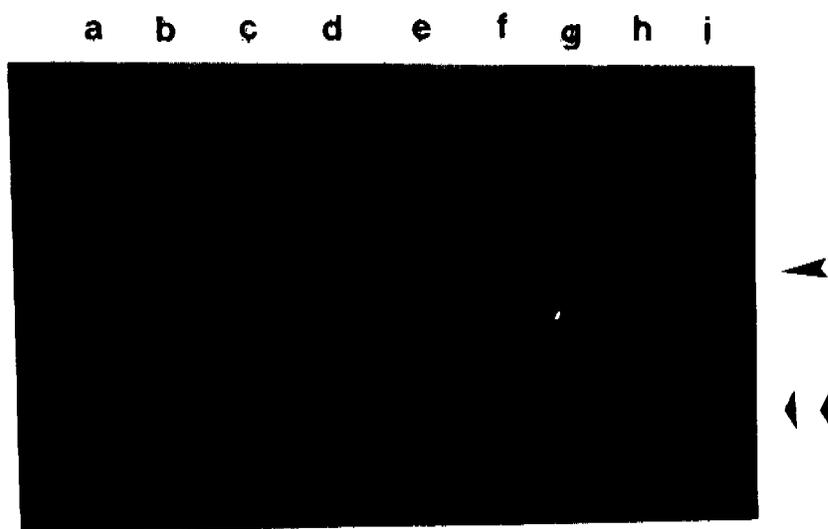


FIG 15. Western-Blot de muestras de interfases provenientes de tejidos de peces enfermos incubado con suero de salmón coho infectado naturalmente con *Piscirickettsia salmonis*. **a, b y c:** salmón coho; **d, e y f:** trucha arcoiris; **g y h:** salmón salar; **i:** EM-90. **Flecha simple:** 50 Kd peso molecular; **flecha doble:** lipopolisacárido.

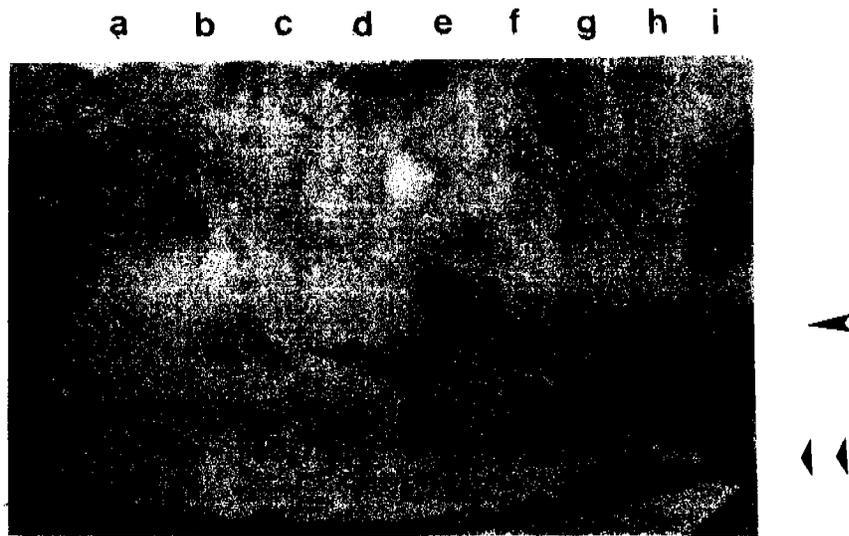


FIG 16. Western-Blot de muestras de interfases provenientes de tejidos de peces enfermos incubado con suero de trucha arcoiris infectada naturalmente con *Piscirickettsia salmonis*. **a, b y c:** salmón coho; **d, e y f:** trucha arcoiris; **g y h:** salmón salar; **i:** EM-90. **Flecha simple:** 50 Kd peso molecular; **flecha doble:** lipopolisacárido.

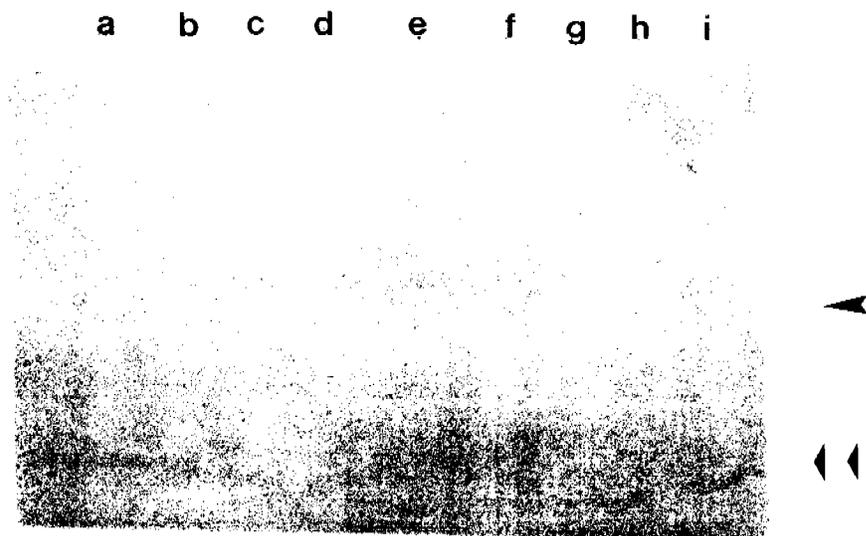


FIG 17. Western-Blot de muestras de interfases provenientes de tejidos de peces enfermos incubado con suero de salar infectado naturalmente con *Piscirickettsia salmonis*.
a, b y c: salmón coho; **d, e y f:** trucha arcoiris; **g y h:** salmón salar; **i:** EM-90.
Flecha simple: 50 Kd peso molecular; **flecha doble:** lipopolisacárido.

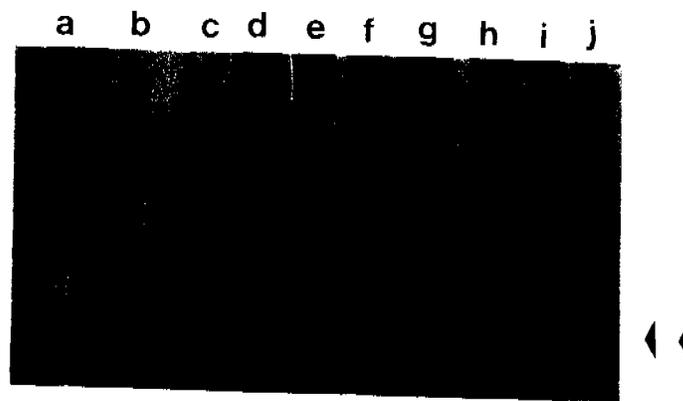


FIG 18. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12 % que muestra la inmunoprecipitación de extractos crudos de peces infectados con *P. salmonis*. **a:** Control negativo, **b:** salmón coho sano sin inmunoprecipitación (s/I); **c:** salmón coho sano con inmunoprecipitación (c/I); **d:** EM-90 s/I; **e:** EM-90 c/I; **f:** Salmón coho enfermo s/I, **g:** Salmón coho enfermo c/I, **h:** Trucha arcoiris s/I; **i:** Trucha arcoiris c/I; **j:** marcador peso molecular. **Doble flecha:** Lipopolisacárido.

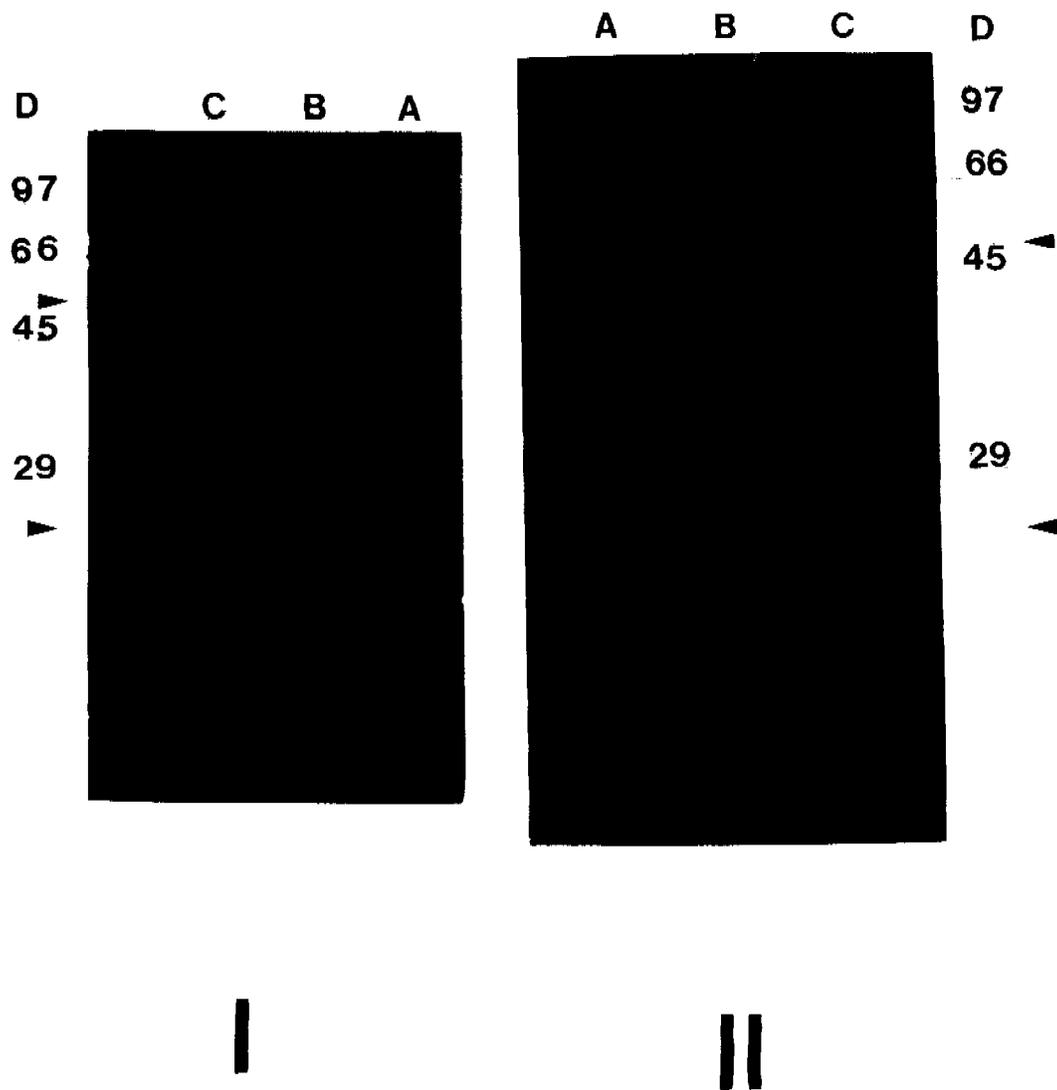


FIG 19. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12 % de los anticuerpos policlonales mono-específicos. **I.** Tinción con Coomassie. **II :** Western blot con suero anti IgG de ratón. **A:** anti EM-90; **B:** anti-aislado de trucha arcoiris; **C:** anti-aislado de salmón coho. Las flechas indican las cadenas livianas y pesadas de las IgGs.

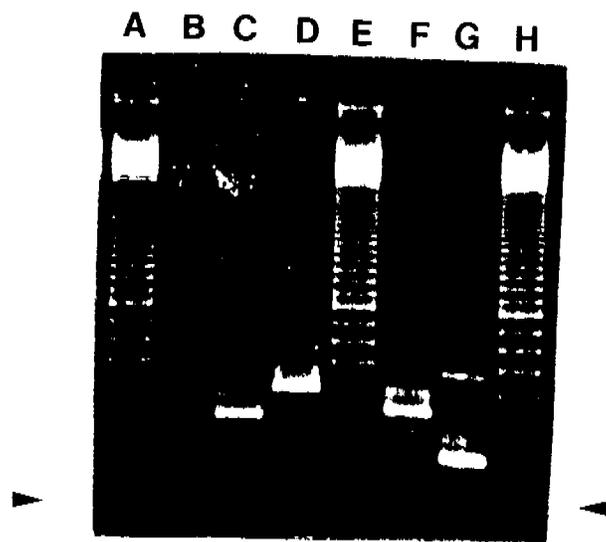


FIG 20.Electroforesis en gel de agarosa al 1 % de los productos amplificados por PCR.

A, E y H: marcador de peso molecular. B: control negativo, DNA suero de pez sano; C, D, F y G: DNA de *P. salmonis* EM-90 con cuatro pares de iniciadores diferentes.

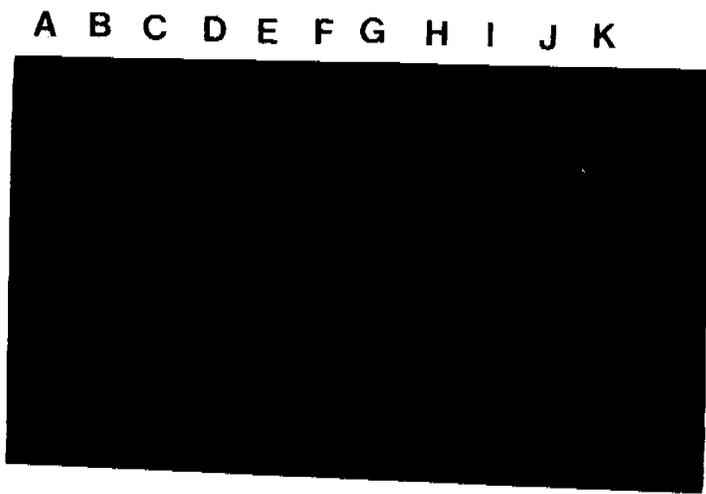
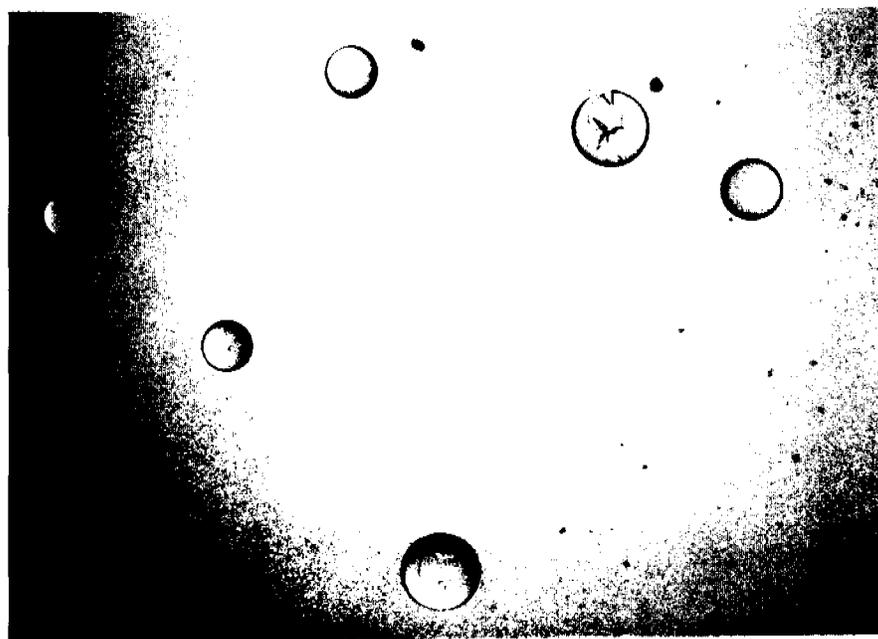


FIG21. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos amplificados por PCR
A y K: marcador de peso molecular, B: *P. salmonis* EM-90; C y D. DNA suero de salmón coho enfermo; E y F: DNA suero trucha arcoiris enferma. G: DNA suero salar enfermo; H, I y J: DNA suero de coho, trucha y salar sanos, respectivamente
Tamaño esperado con par de iniciadores 300 nucleotidos de largo

A
Aumento X35



B
Aumento X50

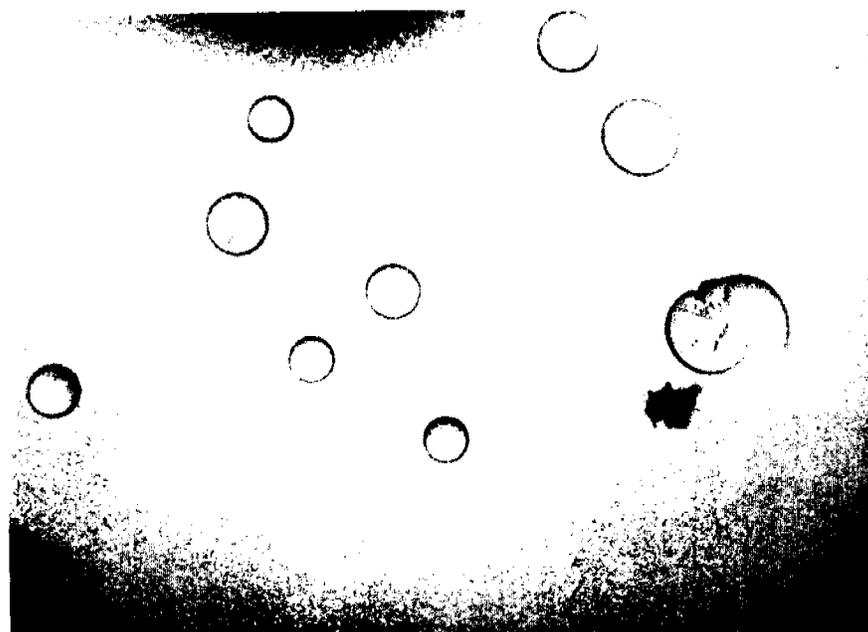


FIG 22. Observación al microscopio de luz de liposomas fosfatidilcolina - LPS obtenidos por centrifugación. Los liposomas se preparan con muestras de LPS procedentes de diferentes especies de salmonídeos infectados, correspondientes a Salmón coho (A) y Trucha arcoiris (B).

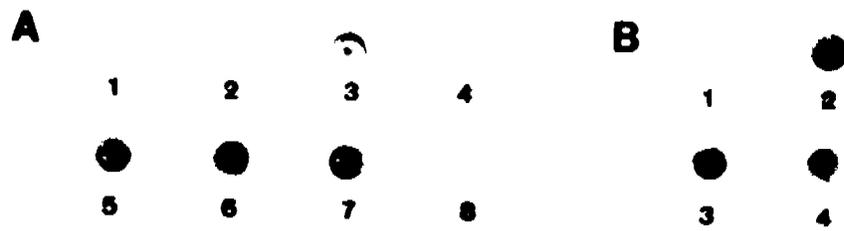


FIG 23. Detección de LPS en liposomas mediante ensayo por dot blot. En A se observan las muestras de Salmón coho infectado (1-2: fracciones sobrenadantes; 5-6: liposomas recuperados por centrifugación) y Trucha arcoiris infectada (3: fracción sobrenadante; 7: liposomas obtenidos por centrifugación). También se muestran las fracciones sobrenadante (4) y liposomas (8) correspondientes a liposomas control que no contienen LPS. En B se muestra el control negativo correspondiente a LPS de *E. coli* (1) y los controles positivos correspondientes a LPS de Salmón coho (2,3) y de Trucha arcoiris (4).

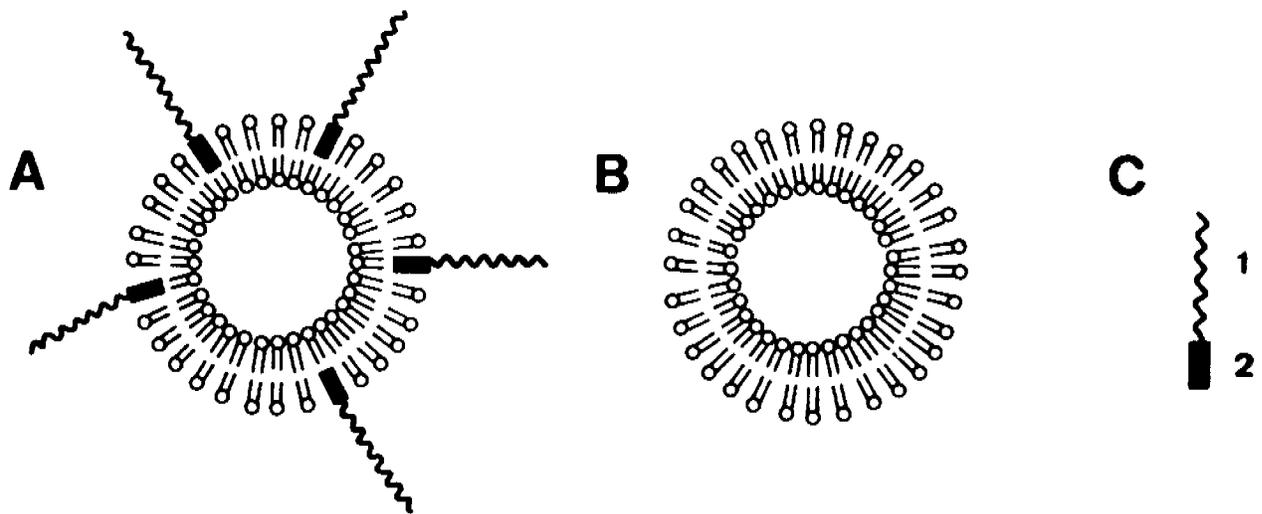


FIG 24. Representación esquemática de liposomas. En A se muestra un liposoma con moléculas de LPS incorporado en la monocapa externa. En B se observa un liposoma que no tiene incorporado el inmunógeno. En C se muestra la estructura básica de la molécula de LPS, indicándose el dominio polar (1) y apolar (2).

ANEXO 4

**“DISEÑO DE ESTRATEGIAS PARA LA APLICACION DE LA MEJOR SONDA
LIPOSOMAL A POBLACIONES NATURALES”**

PROYECTO FIP 95 - 34

“Estudio Inmunológico de *Piscirickettsia salmonis*”

Diseño de estrategias para la aplicación de la mejor sonda liposomal a poblaciones naturales.

Las experiencias de vacunación contra la Piscirickettsiosis que se han realizado hasta la actualidad, han utilizado como antígeno bacterinas de *Piscirickettsia salmonis*, es decir, suspensiones inactivadas del patógeno proveniente de cultivos celulares. Los resultados obtenidos han sido variables y la protección conferida no ha sido suficiente y en algunos casos contradictoria (Smith y col, 1995; Miquel, comunicación personal).

Nuestra propuesta está basada en la selección de al menos un componente estructural del patógeno que se comporte como un buen inmunógeno tanto *in vitro* como *in vivo* y la incorporación de este componente a "liposomas" que actúen como vehículo del antígeno permitiendo su liberación lentamente en el organismo y aumentando así su capacidad de inducir en forma sostenida en el tiempo una respuesta humoral. En ambos casos el componente estructural seleccionado del agente es su lipopolisacárido (LPS).

Los liposomas son vesículas de fosfolípidos las cuales forman espontáneamente bicapas concéntricas cuando son expuestas a soluciones acuosas. La flexibilidad y versatilidad de los métodos para la formulación de liposomas, hacen de ellos un sistema ideal para probar respuestas inmunológicas. Además, los liposomas poseen varias ventajas sobre otros adyuvantes: están constituidos por compuestos biológicos que son biocompatibles y biodegradables, y no han sido asociados con reacciones sistémicas o locales significativas. Por otra parte, en la actualidad existen métodos para la preparación a gran escala de liposomas para su uso en estudios experimentales (Freda, 1995).

Varios trabajos han demostrado la acción de los liposomas como adyuvantes en mamíferos y cualquiera sea la formulación de los liposomas, parece claro que la estimulación del sistema inmune está ligada a las propiedades fisicoquímicas inherentes a la asociación antígeno-liposoma (Freda, 1995).

La capacidad de la asociación liposoma-LPS para actuar como adyuvante inmunológico ha sido investigada y evaluada en mamíferos (Desiderio y Campbell, 1985; Su y Van Rooijen, 1986; Liu y col, 1992; Petrov y col, 1992; Wong y col, 1992; Laing y Threackston, 1993) pero su aplicación en el diseño de vacunas para peces ha sido limitada. Rodgers (1990) comparó la eficacia de una vacuna que contenía antígenos de *Aeromonas salmonicida* con y sin liposomas en un desafío natural contra la Furunculosis. El nivel de protección fue significativamente aumentado cuando la vacuna contenía liposomas. Recientemente, Nakhla y col (1996) han descrito la incorporación de diferentes concentraciones del LPS y del Polisacárido (PS) de *Aeromonas salmonicida*, en distintos tipos de liposomas con el fin de utilizarlas como inmunógenos protectivos contra la Furunculosis.

Durante el desarrollo de este Proyecto hemos encontrado que el componente lipopolisacárido de la membrana externa de *P. salmonis* estimula la respuesta inmune humoral en conejos y en peces. En este trabajo, a su vez, hemos desarrollado sondas liposomales que incorporan antígenos de *P. salmonis* y que pueden ser utilizadas como adyuvante en vacunas para peces.

En base a estos antecedentes y a nuestros resultados, hemos diseñado una estrategia teórica para la aplicación de estas sondas liposomales en poblaciones naturales. Este programa de vacunación constaría de al menos las siguientes etapas:

1. Preparación de la vacuna.
2. Ensayo de toxicidad para peces.
3. Diseño experimental de vacunación.
4. Desafío.
5. Determinación de la eficacia de la vacuna.

1. PREPARACIÓN DE LA VACUNA

1.1. CULTIVO. Debido a que se necesitarían grandes cantidades de antígeno, *P. salmonis* se cultivarían en líneas celulares de peces a gran escala, específicamente, la línea CHSE-214 a 15-18°C durante 10-14 días.

1.2. EXTRACCION LPS. El sobrenadante de los cultivos celulares con efecto citopático total se inactivaría con formaldehído al 0,2 %, las bacterias serían colectadas por centrifugación y posteriormente liofilizadas. El LPS sería extraído a partir de los extractos liofilizados siguiendo el método de extracción de fenol-agua descrito por Westphal and Jann (1965).

1.3. PREPARACIÓN DE LPS ASOCIADO A LIPOSOMAS. El LPS sería incorporado a los liposomas según la técnica descrita en este informe en la sección XX.

2. ENSAYO DE TOXICIDAD

La suspensión de vacuna debería ser ensayada previamente a diferentes concentraciones en peces para probar su inocuidad. Además, sería conveniente probar la vacuna en ejemplares de distintas especies (Salmón coho, salar y trucha) para detectar si existiesen diferencias en la sensibilidad según la especie.

3. DISEÑO EXPERIMENTAL DE VACUNACION

3.1. METODO DE ADMINISTRACION. Actualmente existen los siguientes métodos para administrar vacunas a peces: vía oral, inyección o inmersión. En esta estrategia se probarían los métodos de inyección e inmersión, por las razones que se explican a continuación.

La vacunación oral (mediante el alimento) no es apropiada ya que requiere una gran cantidad de antígeno y por periodos más prolongados, por lo tanto es demasiado cara para

ser utilizada en forma masiva. Por otra parte, los niveles de protección que se alcanzan con este método son muy inferiores a los obtenidos con la inyección y/o inmersión. La inmersión evita el estres y excesiva manipulación de los peces y además, es el mecanismo de introducción del patógeno más parecido a las condiciones naturales. Aunque la inyección tiene la desventaja de ocasionar un estres adicional a los peces y la necesidad de usar anestésicos, produce los mejores niveles de protección con respecto a los otros métodos, la rapidez y duración de la protección también son superiores y tiene la ventaja de que se tiene la certeza de que cada pez a recibido la dosis adecuada. Tanto, la inyección como la inmersión permite su aplicación en forma masiva.

3.2. TAMAÑO DE LOS PECES Y DE LOS GRUPOS

El tamaño ideal de los peces para ser vacunados sería el estado de smolt de agua dulce semanas antes de ser trasladados a agua de mar, ya que los brotes más graves de Piscirickettsiosis se producen algunas semanas después de que los smolt han sido transferidos a agua de mar.

Los peces vacunados por inmersión serán puestos en contacto con la vacuna por 2 min y posteriormente serán transferidos a tanques individuales. La inyección intraperitoneal se hará previo anesteciamiento de los peces.

Los peces deben ser alimentados normalmente durante el periodo del ensayo. La temperatura debe registrarse por lo menos dos veces al día durante todo el experimento.

Todos los peces serán transferidos inmediatamente a tanques individualizados por grupo, con aireación y flujo de agua constantes. Los grupos de peces a tratar deberan ser de al menos 50 individuos por grupo. Por cada vía de administración deben probarse al menos tres grupos:

Grupo 1: Control 1, inoculados sólo con el diluyente de la vacuna.

Grupo 2: Control 2, inoculados con los liposomas

Grupo 3: Vacunados, inoculados con la preparación de liposomas y LPS de *P. salmonis*.

Podrían existir más grupos de peces vacunados en función de la concentración de la vacuna o del LPS, los que serán establecidos en base al ensayo de toxicidad.

4. DESAFIO

El desafío consistirá en someter a los grupos de peces vacunados y controles a una inoculación artificial con *P. salmonis* mediante inyección intraperitoneal de un aislado probadamente virulento. Se debe inocular al menos la Dosis letal 50, la que ha sido previamente establecida. El desafío debería realizarse algunas semanas después de que los peces han sido trasladados al agua de mar.

Se deben observar los peces diariamente y registrar la morbilidad y mortalidad. Las causas de la mortalidad deben ser determinadas, es decir, el patógeno debe ser reaislado a partir de los peces moribundos. Las infecciones no específicas no deben exceder el 10 % en cualquier grupo.

Descartamos la posibilidad de un desafío natural ya que sería imposible controlar todas las variables y por lo tanto, complicaría la interpretación de resultados.

5. DETERMINACION DE LA EFICACIA DE LA VACUNA

Los métodos tradicionales para medir la efectividad de una vacuna son : el cálculo del porcentaje relativo de sobrevivencia (RPS) y el aumento de la Dosis letal 50 (LD50).

En nuestra propuesta realizaremos el análisis mediante el cálculo del Porcentaje Relativo de Supervivencia, ya que es más sencillo de aplicar a gran escala.

El cálculo del RPS se realiza mediante la siguiente fórmula:

$$\text{RPS} = 1 - \frac{\% \text{ mortalidad grupo vacunado}}{\% \text{ mortalidad grupo control}} \times 100$$

La mortalidad del grupo vacunado debería ser inferior al 24 % para poder considerar el test como positivo.