



UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
INSTITUTO DE PATOLOGIA ANIMAL

**Evaluación de nuevos anticuerpos monoclonales contra diferentes
antígenos de *Renibacterium salmoninarum* para el
diagnóstico inmunoenzimático (ELISA) de la
Enfermedad Bacteriana del Riñón (B K D)
en peces salmonídeos.**

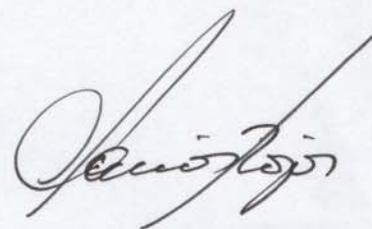
Tesis de Grado presentada como parte de
los requisitos para optar al Grado de
LICENCIADO EN MEDICINA
VETERINARIA.

JUAN PABLO LOPEZ CLASING

VALDIVIA - CHILE

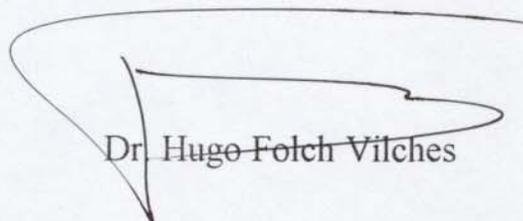
1997

PROFESOR PATROCINANTE :



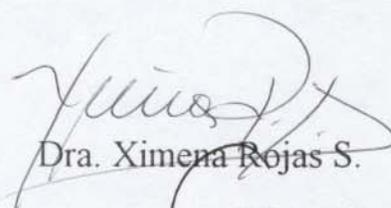
Dr. Carlos Farías Rojas

PROFESOR COPATROCINANTE :

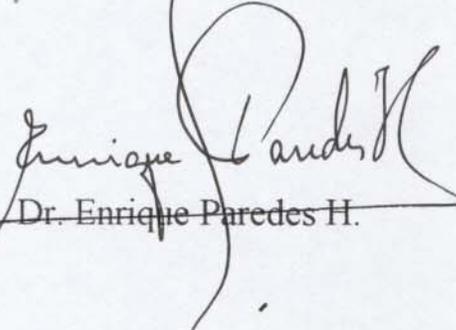


Dr. Hugo Folch Vilches

PROFESORES CALIFICADORES :



Dra. Ximena Rojas S.



Dr. Enrique Paredes H.

FECHA DE APROBACION :

16 de Julio de 1997 .

A mí madre, con cariño.

INDICE

<u>Capítulo</u>	<u>Pág.</u>
1. Resumen	1
2. Summary	2
3. Introducción	3
4. Material y métodos	11
5. Resultados	18
6. Discusión	26
7. Bibliografía	32
Anexos	38
Agradecimientos	48

1. RESUMEN

En los últimos años *Renibacterium salmoninarum* el agente de la Enfermedad Bacteriana del Riñón (BKD), ha sido objeto de intensa investigación tendiente a su prevención y control. Sin embargo esta enfermedad continúa siendo una de las principales causas de mortalidad en la salmonicultura mundial. Sin duda el éxito en el control de BKD se basa en la eficiente y oportuna detección del patógeno en los peces infectados, particularmente en los reproductores que son portadores asintomáticos del patógeno. El ensayo inmuno-enzimático (ELISA) es la técnica diagnóstica más utilizada y confiable, sin embargo, los actuales kits comerciales de ELISA para BKD poseen problemas de reacción cruzada con otras bacterias y/o detectan un sólo antígeno denominado proteína p57, la cual se encuentra en muy baja concentración en peces tratados con antibióticos o que son portadores asintomáticos.

En el presente estudio, se estandarizó un test ELISA basado en nuevos anticuerpos monoclonales específicos contra *R. salmoninarum*. El aislado ATCC 33209, cultivado en agar KDM-2, se utilizó como control positivo.

Se realizó el análisis de 7 diferentes líneas celulares de hibridomas. Todos ellos se cultivaron en medios RPMI y DMEM y lograron una adecuada densidad celular, sin embargo, sólo el 11D11 logró producir anticuerpos monoclonales.

Se diseñó y evaluó un test de ELISA mixto, en el cual participaron anticuerpos policlonales y el monoclonal 11D11. Además, el nuevo ELISA fue comparado con un kit comercial de características similares. Para ello, se analizaron 50 muestras de tejido renal de peces salmónidos sospechosos de BKD con ambos test ELISAs, no encontrándose diferencia estadística significativa entre ellos.

Se realizó además la comparación entre los anticuerpos monoclonales 11D11 y otro de origen comercial. Se analizaron 50 muestras de tejido renal sospechosos de BKD. Tampoco existió diferencia estadística significativa. El nuevo ELISA fue además, analizado utilizando antígenos purificados (proteína p57 y productos extracelulares) de *R. salmoninarum* frente a los cuales obtuvo adecuados niveles de detección. En el estudio de reacción cruzada, no se observó reactividad con ninguna de las bacterias patógenas utilizadas.

Palabras claves: BKD, ELISA, Anticuerpo monoclonal, *Renibacterium salmoninarum*.

2. SUMMARY

In the last five years, *Renibacterium salmoninarum* the etiological agent of Bacterial Kidney Disease (BKD), have been under intensive research intended to prevent and to control the disease. In spite of this, BKD still is one of the main sources of mortality among the fish. There is no doubts that the control of BKD is based on the efficient and prompt detection of the pathogen in infected animais, particularly the broodstock which are asymptomatic carriers of the disease. The enzyme-linked immunoabsorvent assay (ELISA) is the most used and reliable the diagnostic techniques available for BKD. However, the commercial ELISA kits available for this pathogen have been shown some technical problems due to cross reaction with other bacterial species and/or for the detection of only one antigen of the pathogen, the p57 protein, which have been found at very low concentrations in antibiotic treated fish and also in the carriers .

In the present study, an ELISA test was standardised. It was based on a library of novel and specific monoclonal antibodies against *R. salmoninarum*. The type isolated ATCC 33209, grown in KDM-2, was used like positive control.

Seven hybridoma cell lines cultured in RPMI and DMEM media. All of them obtained a good cellular densities, but only the 11D11 was shown to produce monoclonal antibodies. The ELISA test was used designed using both polyclonal and monoclonal antibodies 11D11. Later it was compared with a commercially available ELISA kit. To do this , 50 kidney tissue samples suspected to be infected with the pathogen were submitted to both ELISA test. No statistic difference between them were found. The monoclonal antibody 11D11 was also compared with a similar commercially available antibody using 50 kidney tissue samples suspected of BKD. Once again, no statistic difference between them were found.

The new ELISA was also tested using purified antigens (p57 protein and extracellular products) of *R. salmoninarum* which showed good detection levels. In the cross reaction study, none of the bacterial species included in the analysis showed reaction with monoclonal antibody 11D11.

Key words: BKD, ELISA, Monoclonal antibody and *Renibacterium salmoninarum* .

3. INTRODUCCION

La superación de los US \$500 millones en divisas, por concepto de exportaciones del sector acuícola chileno durante la temporada de 1995, demuestra la importancia que este sector ha alcanzado dentro de la pesquería nacional (Méndez, 1996). Dentro del sector, el mayor porcentaje de participación en volúmenes de producción fue aportado por los salmónidos, con un 94,4 % (Campos, 1996), lo que en toneladas cosechadas durante ese año equivalen a 111.600. De éste modo, Chile se consolida como el segundo país productor de salmón en el mundo (Méndez, 1996).

La situación de Chile en el universo de los países salmoneras se considera favorable. Esto sin duda se debe a algunas ventajas comparativas como son, por ejemplo, la diferencia de estacionalidad con el Hemisferio Norte, principal mercado para Chile y el bajo costo de la mano de obra, de entre otros (Méndez y Munita, 1989). A lo antes mencionado, hay que agregar las excelentes condiciones hidrológicas del sistema acuícola del Sur de Chile (Campos y col., 1980).

Esta actividad, la cual ya ha demostrado un enorme potencial, podría verse seriamente afectada sino se consideran algunas limitantes propias de la explotación intensiva de salmonídeos. Parte del éxito de la salmonicultura a corto o largo plazo está íntimamente relacionado con la presencia de enfermedades en los peces. En Chile gran parte de las pérdidas debidas a enfermedades son causadas por agentes bacterianos. Al respecto, el estudio realizado por el Servicio de Ictiopatología de Fundación Chile, indicó que, para la temporada 1991-1992, se produjeron pérdidas por US \$85 millones, siendo estas valorizadas por etapas productivas separadas (Bustos, 1993).

Actualmente una de las enfermedades bacterianas de mayor importancia en los salmonídeos en condiciones de cultivo es la Enfermedad Bacteriana del Riñón (BKD: Bacterial Kidney Disease). Esta enfermedad, presente solamente en los salmónidos, tiene un rango de distribución tan amplio como es el rango de distribución de estas especies. BKD es considerada una de las enfermedades bacterianas más insidiosas y difíciles de controlar. Aunque ataca de preferencia al riñón, también afecta a otros órganos en forma lenta y progresiva de manera que cuando los síntomas clínicos se hacen evidentes, la infección ya es sistémica (Solar y Evelyn, 1991).

La prevalencia de BKD en Chile no está clara. Silva del Pozo (1990), quien solamente la midió en el salmón del Pacífico (*Oncorhynchus kisutch*), encontró una prevalencia general de un 19,26 %. En tanto que cinco años después, Henríquez (1996), determinó una prevalencia general para BKD de solo un 5 %, al medirla en las tres especies salmonídeas de mayor importancia para la salmonicultura nacional.

El agente etiológico del BKD es *Renibacterium salmoninarum*, éste es un diplobacilo que mide 0,3 a 1,5 x 0,1 a 1,0 µm; Gram positivo, inmóvil, aerobio, ácido-alcohol sensible, no esporulado y no encapsulado (Munro y Bruno, 1988). También han sido observadas formas pleomórficas de la bacteria a nivel intracelular en tejidos infectados y en algunos cultivos de laboratorio (Sanders y Fryer, 1980).

La enfermedad, así como la bacteria que la produce, fueron descritas por primera vez en Escocia por científicos del Comité de la Furunculosis en 1933 y posteriormente fue aislada por Belding y Merrill (1935) en USA, quienes reprodujeron la enfermedad en forma experimental (Roberts, 1981).

Para el cultivo de *R. salmoninarum* se utilizan habitualmente dos medios, el preparado comercial Mueller Hinton y el medio a base de suero KDM-2, desarrollado por Evelyn (1978). Todos los medios requieren de la adición de un 0,1 % de L-cisteína (Munro y Bruno, 1988). Otros medios empleados son el KDM-C, en el cual el suero es substituído por carbón activado, probablemente por sus propiedades absorbentes de toxinas y más recientemente se ha utilizado el caldo complejo (CBS), desarrollado por Shieh (Klempau y Smith, 1993). El crecimiento de la bacteria es muy lento y la visualización de las primeras colonias puede requerir de 3 a 6 semanas. Este crecimiento tan lento sobre los medios ha sido atribuido a las exigencias del organismo y a la potencial presencia de sustancias tóxicas en los tejidos afectados por el patógeno (Stoskopf, 1993).

Característicamente *R. salmoninarum* forma colonias cremosas, no pigmentadas, brillantes, lisas, redondeadas, levantadas, íntegras y con unos 2 mm de diámetro después de una incubación a 15° C por 20 días. En cultivos con más de 12 semanas, la apariencia de las colonias puede tornarse granular y cristalina (Austin y Austin, 1987). Aislados de distintas cepas han mostrado uniformidad en cuanto a sus propiedades bioquímicas. Dentro de las reacciones para las que fueron positivas, se incluyen β-hemólisis, licuefacción de la gelatina, producción de catalasa y DNasa; mientras que algunas de las reacciones para las que fueron negativas son la producción de indol, rojo metilo, citocromo-oxidasa y la producción de ácidos a partir de azúcares. El perfil obtenido al usar el sistema API-ZYM (API Laboratory Products), es único entre las patógenos de peces y es suficiente como para distinguirla de otras bacterias (Munro y Bruno, 1988).

La pared celular de *R. salmoninarum* está conformada por un polisacárido el cual se encuentra covalentemente unido a un peptidoglicano. Este último posee un puente peptídico compuesto por el ácido glutámico, usina, alanina y glicina (en una relación molar de 1:1:4:1), esta secuencia de aminoácidos en el puente sería única dentro de las bacterias Gram positivas (Fiedler y Draxl, 1986). Experimentos de inmunización, mostraron la formación de anticuerpos contra este polisacárido, al inyectar células bacterianas previamente tratadas con tripsina. El polisacárido unido al peptidoglicano en la pared celular de *R. salmoninarum* es un antígeno somático en el cual un residuo galactosídico cumple la función de un determinante antigénico (Fiedler y Draxl, 1986).

Altas concentraciones de una proteína de 57 kDa han sido encontradas en el suero y tejidos de peces infectados tanto natural como experimentalmente. Esta proteína p57 corresponde al antígeno proteico predominante sobre la superficie de la bacteria y es el mayor constituyente de las proteínas extracelulares aisladas desde el sobrenadante de los cultivos (Getchell y col., 1985). No fue hasta 1990 que Dubreuil, reportó la presencia de una pequeña fimbria peritrica, de menos de 2 nm de diámetro en la superficie de *R. salmoninarum*. En posteriores análisis hechos a la fimbria se encontró que esta tenía muchas características similares con la proteína de 57 kDa, previamente descrita, llegándose a la conclusión de que eran lo mismo. La función de esta proteína se desconoce, sin embargo estudios *in vitro* sugieren actividad del tipo hemoaglutinante para eritrocitos de conejo, caballo y rata; aglutinación espermática en salmones, hidrofobicidad de la pared celular (Daly y Stevenson, 1990), inmunosupresión linfocitaria (Turaga y col., 1987) y aglutinación de leucocitos de salmónidos (Wiens y Kaatari, 1991).

La Enfermedad Bacteriana del Riñón puede ser transmitida tanto horizontal como verticalmente. Peces infectados subclínicamente o en estado de portadores son los reservorios de la infección (Bullock y Hermán, 1988). Otra característica importante en su transmisión es que ha mostrado supervivencia en el agua dulce hasta por 21 días (Austin y Rayment, 1985) y por 12 días en el agua de mar (Evelyn, 1988).

Los gametos femeninos juegan un rol fundamental en la transmisión vertical. Los individuos machos tendrían poca o nula importancia en este proceso (Elliot y col. 1989). La vía exacta de ingreso del patógeno en la transmisión horizontal, aún no es clara, sin embargo basándose en las lesiones propias de la enfermedad, la piel, los ojos y el sistema digestivo jugarían un rol importante (Farías, 1995).

La infección con *R. salmoninarum* resulta en una enfermedad sistémica y crónica. Una vez que ingresa en el huésped, la bacteria es fagocitada por los macrófagos donde aparentemente sobreviven y proliferan. Dentro de la célula fagocítica, la bacteria escapa rápidamente del fagolisosoma al citoplasma, probablemente mediante algún factor que daña la membrana (Gutemberg, 1993). Esta capacidad de sobrevivir en el sistema inmune es muy importante en la patogénesis de la enfermedad. El microorganismo puede inactivarse por un tiempo y pasa a ser un residente normal del tejido renal, hasta que factores estresantes pueden disminuir los mecanismos de defensa inmune, lo cual permitiría la proliferación bacteriana y que se presente la enfermedad (Stoskopf, 1993).

La proteína fimbrial está estrechamente relacionada con la virulencia del patógeno (Bruno, 1990). Debido a las altas concentraciones del antígeno de 57 kDa, que casi siempre se observan, podría ocurrir una tolerancia por zona alta o dosis alta, fenómeno que representa una carencia de respuesta inmune clásica, producto de la presencia crónica de grandes cantidades de antígeno soluble. Esto a su vez puede llevar a la formación de complejos inmunes e hipersensibilidad del Tipo III alojada en el riñón, lo que causaría las lesiones granulomatosas en el mesonefro de los salmones con BKD (Kemplau y Smith, 1993).

Los peces enfermos de BKD pueden no presentar signos externos, como también pueden mostrar uno o más de los mencionados a continuación: palidez branquial indicativo de anemia, exoftalmia, distensión abdominal (por la presencia de ascitis), presencia de ampollas con un fluido turbio en la piel, úlceras dérmicas, hemorragias (particularmente alrededor del ano) y más esporádicamente, cavernas musculares llenas de material caseoso o necrótico. Internamente podemos encontrar la presencia de fluido turbio tanto en la cavidad abdominal como en la pericárdica, también se pueden encontrar hemorragias en las visceras y la formación de una capa membranosa sobre uno o más de los órganos internos. Pero lo más característico es una lesión granulomatosa blanquecina en el riñón y menos frecuentemente en el bazo y el hígado (Inglis y col., 1993). Histológicamente las lesiones son difusas, correspondiendo a una respuesta inflamatoria granulomatosa por una bacteremia, pero que no se limita solamente al riñón (Bullock y Hermán, 1988).

La detección y diagnóstico del BKD se realiza por medio de los signos clínicos, aislamiento e identificación del agente *R. salmoninarum* y por la utilización de métodos serológicos como EFAT o ELISA (Barrientos, 1995).

El control de la enfermedad ha sido difícil, considerándose que BKD es la enfermedad bacteriana de los peces más difícil de tratar (Austin y Austin, 1987), esto por el hecho que el patógeno se encuentra frecuentemente en el interior de las células fagocíticas del pez huésped, y por lo tanto, fuera del alcance de los antibióticos y anticuerpos. Debido a esto, una vez que el tratamiento se interrumpe, la enfermedad vuelve a aparecer. Se ha tratado de detener la transmisión vertical usando iodóforos y eritromicina en la desinfección superficial de las ovas, lo cual sólo logra disminuir el número de bacterias, pero no interrumpe la transmisión (Evelyn y col., 1986). Mejores resultados se han obtenido al utilizar la eritromicina en dosis de 10 a 20 mg por kg de peso corporal alrededor de 4 semanas antes del desove, con lo cual se obtienen concentraciones apropiadas del antibiótico, tanto en el vitelo de las ovas, como en el de los alevines, con lo cual la prevalencia de la enfermedad desciende casi a cero (Estay y col., 1995).

En cuanto a vacunas, se han evaluado varias preparaciones en trucha arco iris y salmón del Atlántico, las cuales contienen células muertas de *R. salmoninarum* (por medio de calor o formalina), administradas vía alimentación, aerosoles, inyección intraperitoneal, inmersión directa o infiltración hiperosmótica, sin embargo los resultados son poco concluyentes. En estudios dirigidos a la inmunización de salmón del Pacífico, particularmente, coho y sockeye, los resultados han sido aún menos satisfactorios, aún cuando los peces tratados han demostrado cierto grado de respuesta inmunológica al producir anticuerpos en presencia del antígeno foráneo, la mortalidad por BKD en estos peces no fue diferente a la observada en el grupo control (Solar y Evelyn, 1991).

También se ha investigado sobre la resistencia genética de los peces al BKD. En el salmón coho existen tres genotipos para las transferrinas (AA, AC y CC); en peces experimentalmente infectados se determinó que el genotipo más susceptible era el AA y a su vez el más resistente era el CC (Suzumoto y col., 1977). En el salmón del Atlántico se

han determinado algunas variedades más resistentes como las 84JC, 87JC y la 90JC (O'Flynn y col., 1996).

En cuanto al diagnóstico de BKD, es muy importante tener presente que peces sin signos clínicos de la enfermedad pueden contener hasta más de 1×10^6 bacilos/ml de líquido celómico, indicando ésto la necesidad de disponer de técnicas de detección que vayan más allá de la simple observación anatómica. Más aún, las instalaciones para la crianza de salmones en gran escala, requieren de métodos de diagnóstico rápidos, sensibles y confiables para poder aplicar eficientemente los métodos de "culling" que corresponden a la eliminación de ovas fertilizadas o gametos provenientes de reproductores infectados (Klempau y Smith, 1993).

Es evidente que los cultivos bacterianos, útiles en algunas aplicaciones de investigación, no son prácticos como herramienta diagnóstica, por su largo período de incubación (Solar y Evelyn, 1991). En el caso de la tinción de Gram, una técnica bacteriológica de amplia utilización, aunque rápida y de bajo costo, carece de la especificidad requerida para diagnosticar una especie en particular, por lo que se utiliza como un diagnóstico presuntivo. Es importante mencionar que su sensibilidad es la más baja dentro de las técnicas existentes, ya que detecta sólo 10^6 a 10^7 células de *R. salmoninarum* por frotis de riñón (Bullocky col., 1980).

En base a las reacciones antígeno-anticuerpo se han desarrollado diferentes técnicas de diagnóstico, algunas de ellas son: la Pueba de Inmunodifusión (Chen y col., 1974), Coaglutinación (Kimura y Yoshimizu, 1981), Contraimmunoelectroforesis (Cipriano y col., 1985), el ensayo de anticuerpos fluorescentes (FAT : fluorescent antibody test) en sus versiones directa e indirecta (IFAT) (Bullock y Stuckey, 1975; Bullock y col., 1980). Luego Elliot y Barilla (1987) implementaron una combinación de filtración e inmunofluorescencia (MFAT). Además están los ensayos inmunoabsorbentes, como el ensayo Dot-Blot, el sistema Peroxidasa-Antiperoxidasa (PAP) (Sakai y col., 1987) y el inmunoensayo enzimático (ELISA) basado en anticuerpos policlonales (Dixon, 1987) y monoclonales (Rockey y col., 1991). Recientemente, se han desarrollado técnicas basadas en la reacción de la polimerasa en cadena (PCR), la cual es considerada como la más sensible de las técnicas diagnósticas disponibles en la actualidad (Butendieck y col., 1995).

De todas las técnicas serológicas disponibles para la identificación de *R. salmoninarum*, en nuestro país las que más se utilizan en forma rutinaria son el IFAT y el ELISA (Barrientos, 1995).

El IFAT es un método relativamente simple, de alto costo, que requiere de mucho tiempo para realizar las observaciones, su aplicabilidad en terreno es muy limitada y cuya sensibilidad ha sido criticada por la alta tasa de falsos negativos (Klempau y Smith, 1993), un ejemplo de ello se dio en la Columbia Británica, donde el IFAT demostró no ser suficientemente sensible al fallar el 50 % de las veces en la detección de la bacteria, incluso en concentraciones tan altas como 10^4 células/ml de fluido celómico (Solar y Evelyn, 1991).

El ELISA consiste básicamente en una reacción antígeno-anticuerpo, la que se produce en el sitio de unión del antígeno o anticuerpo a una fase sólida. Mediante una serie de lavados se remueven aquellos compuestos que no han reaccionado. Se cuantifica la reacción antígeno-anticuerpo midiendo la reactividad de la enzima conjugada a uno de los componentes anteriores, sobre un substrato, este substrato está en proporción a la cantidad de anticuerpos o antígenos presentes en la reacción (Alton y col. 1988).

En el ELISA directo sólo participa el antígeno y un sólo anticuerpo, estando conjugado con la enzima uno de estos dos componentes, dependiendo de lo que se desee determinar. Por otra parte, en el ELISA indirecto además participa una antiglobulina especie-específica conjugada con una enzima. En las modalidades sandwich y de competencia, participan básicamente los mismos componentes y la diferencia radica en la secuencia de la reacción (Dinter, 1989).

Entre las ventajas del ELISA se destacan, su alta sensibilidad y especificidad; el detectar mínimas concentraciones de antígenos o anticuerpos y presentar una alta repetitividad. El ELISA permite además, lograr elevados niveles de automatización, permitiendo el procesamiento de un gran número de muestras en un corto período de tiempo. En cuanto a sus desventajas, se debe considerar su alto costo inicial, ya que requiere de un equipamiento especial, adiestramiento del personal que realiza la prueba y la participación de una serie de reactivos que deben estar bien estandarizados, entre otros factores (Meléndez, 1993).

Actualmente existen diferentes kits de ELISA para BKD en el mercado, algunos utilizan anticuerpos policlonales y otros monoclonales. En el caso de los ELISA policlonales pueden arrojar un elevado nivel de falsos positivos, debido a que el suero policlonal utilizado en la técnica puede cumplir la función de reconocimiento de proteínas de peso molecular similar a la p57, de bacterias catalogadas de reactividad cruzada con *R. salmoninarum* como lo son *Corynebacterium aquaticum*, *Carnobacterium piscícola*, *Pseudomonas sp.* (Yoshimizu y col., 1987), *Broccotrix sp.* (Reddington, 1995)¹. Así se han obtenidos resultados, en que para las mismas muestras, el porcentaje de positividad con un ELISA policlonal ha sido de 15,8 %, mientras que con el ELISA monoclonal fue de 4,5 %, lo que establece una diferencia estadísticamente significativa entre ambas pruebas (Barrientos, 1995).

Un anticuerpo monoclonal es una glicoproteína sintetizada por un clon de hibridomas o células híbridas. Su producción involucra la fusión de dos tipos celulares, linfocitos B (previamente estimulados en forma específica por un inmunógeno) y células de

¹ Comunicación personal, 27 Cannon Road, Wilton CT 06897, USA .

mieloma (linfocitos B tumorales, no formadores de anticuerpos) según la técnica desarrollada por Milstein y Köler (1975).

La expansión de los hibridomas generados pueden realizarse *in vivo*, como tumor ascítico, o *in vitro*, en frascos de cultivo o en bioreactores. La principal ventaja de los anticuerpos monoclonales está relacionada con la especificidad, entendida como la capacidad de unión del anticuerpo con un epítoto (determinante antigénico) de un antígeno específico. Otras ventajas importantes son su homogeneidad bioquímica, lo que se traduce en avidez y afinidad homogénea por epítotos definidos, la capacidad de obtener cantidades ilimitadas de un anticuerpo monoclonal específico y la posibilidad de inmortalizar los hibridomas, mediante la congelación, por períodos ilimitados (Eshar, 1990; Alberts y col, 1994).

Estas características de los anticuerpos monoclonales han ido complementando y en alguna medida reemplazando las preparaciones de anticuerpos policlonales en la investigación, ya que éstos por su carácter agotable, heterogéneo y poco específico, impiden conseguir la repetición exacta y lograr la sensibilidad que se demanda en algunas técnicas tales como el ELISA.

Entre las desventajas de los anticuerpos monoclonales se mencionan que por el hecho de estar dirigidos contra un sólo epítoto, generalmente no son precipitantes ni aglutinantes. Por la misma razón su sensibilidad como inmunosondas en test directos o indirectos es moderada, siendo conveniente la amplificación de la reacción antígeno-anticuerpo (Cortes, 1994), mediante el sistema avidina-biotina, entre otros.

Actualmente los kits de ELISA para BKD, basados en anticuerpos monoclonales detectan sólo el antígeno denominado proteína 57 (p57). Estos kits poseen muy buena sensibilidad y especificidad particularmente en casos de infección activa, en donde la producción de la p57 puede llegar a 1 mg/ml de suero de pez infectado (Farías y col., 1994). Se debe tener en cuenta que mediante esta técnica se han detectado hasta 2 ng de antígeno purificado en PBS-T20 (Pascho y Mulcahy, 1987) y que según Hsu y col. (1991) al usar anticuerpos monoclonales se pueden detectar concentraciones menores a 0,05-0,1 ng /ml de antígeno.

Cabe destacar que existen evidencias que indican que la p57 podría verse afectada por los tratamientos con eritromicina que reciben los reproductores y por las proteasas liberadas al macerar tejido renal (Barrientos, 1995). Además se desconoce si la proteína p57 es producida en la fase latente de la enfermedad. De todas maneras se sospecha que su concentración en el suero y tejidos de los peces portadores asintomáticos está considerablemente reducida. Adicionalmente, se ha reportado que la p57 posee homólogos inmunológicos en otras especies bacterianas (Wood y col., 1995), lo que sumado a su baja concentración en peces portadores asintomáticos, podría reducir la sensibilidad de los kits de ELISA monoclonales que hoy en día son usados.

Por ello una muy buena alternativa sería la utilización de anticuerpos monoclonales que detecten tanto la p57, como también el enlace peptídico del peptidoglicano ubicado en la pared celular de *R. salmoninarum*, el cual es único dentro de las bacterias Gram positivas (Farías, 1996)². Esto podría mejorar notablemente la sensibilidad y confiabilidad de los actuales kits comerciales.

Teniendo en consideración todos los antecedentes previamente presentados, se evaluó la utilidad de una serie de nuevos anticuerpos monoclonales en el desarrollo de un kit ELISA específico para la detección de *R. salmoninarum*. La hipótesis planteada en este estudio corresponde a: **Nuevos anticuerpos monoclonales contra antígenos extracelulares y de la pared celular de *R. salmoninarum* son buenos candidatos para el desarrollo de un kit de ELISA para la detección de este patógeno.** Para comprobar esta hipótesis se determinaron los siguientes objetivos:

- Estandarizar un kit de ELISA monoclonal, basado en nuevos anticuerpos monoclonales para la detección de *R. salmoninarum* en muestras biológicas de peces salmonídeos.
- Comparar la sensibilidad del nuevo kit ELISA con algún kit disponible comercialmente.
- Determinar la especificidad del nuevo kit ELISA usando una colección de bacterias patógenas para peces.

²

Comunicación Personal, Universidad Austral de Chile.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. MATERIAL BIOLÓGICO

4.1.1. Bacterias

El aislado tipo de *Renibacterium salmoninarum*, ATCC 33209, se obtuvo desde la American Type Culture Collection, USA. La bacteria fue enviada liofilizada y se mantuvo en esta condición a 4° C hasta su uso. Otras especies bacterianas tales como *Aeromonas salmonicida*, *Carnobacterium piscícola*, *Corynebacterium sp*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomona sp* y *Yersinia ruckeri* fueron obtenidas desde la Unidad de Ictiopatología de la Universidad Austral de Chile .

4.1.2. Hibridomas

Siete líneas celulares de hibridomas productores de anticuerpos monoclonales contra distintos antígenos de *R. salmoninarum*, fueron obtenidos desde el Aquatic Vaccine Unit. Institute of Aquaculture, University of Stirling. Todos ellos se mantuvieron criopreservados en nitrógeno líquido, hasta el momento de su utilización. La caracterización de estos anticuerpos monoclonales se presenta en la tabla N° 1.

Tabla N° 1 Caracterización de los anticuerpos monoclonales utilizados en el presente estudio (Farías, 1995).

HIBRIDOMA	ISOTIPO	ANTÍGENO QUE RECONOCE
14C2	IgM	Peptidoglicano
9F5	IgG1	Peptidoglicano
5A11	IgG1	Antígeno p57
1C7/3D1	IgM	Antígeno p57
1C7/3E1	IgM	Antígeno p57 y 2 proteínas desconocidas (PM > 100kDa)
11D11	IgM	Peptidoglicano y antígeno p57
12B7	IgM	Peptidoglicano

4.1.3. Muestras biológicas

El material biológico utilizado para realizar el test de ELISA consistió de tejido renal proveniente de peces sanos y/o naturalmente infectados. Todas las muestras se obtuvieron de empresas salmoneras de la IX y X Regiones, las cuales ingresaron al Servicio de Diagnóstico de Ictiopatología como parte de un programa de chequeo sanitario

de reproductores para la detección de BKD utilizando el kit ELISA comercial K-Dtect®. Las muestras fueron luego congeladas a -20°C hasta su uso.

4.2. MEDIOS DE CULTIVO

Todos los medios y reactivos utilizados para el cultivo, tanto de las bacterias, como de los hibridomas se describen en los anexos N° 1 y 2.

4.3. MATERIAL SEROLÓGICO

4.3.1. Anticuerpos y conjugados

La HRP Anti-Mouse IgG (Sheep); corresponde a un anticuerpo anti-IgG de ratón, producido en oveja, conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP). Este anticuerpo conjugado se obtuvo desde la Scottish Antibody Production Untt (SAPU), Law Hospital, Carluke, Lanarkshire Scotland, Gran Bretaña .

El Anti-Mouse IgM (μ -chain specific) Biotin Conjugated (Goat) es un anticuerpo anti-IgM de ratón, específico para la cadena μ , producido en cabra y conjugado con biotina. Se obtuvo de Sigma Chemical Company, St. Louis, MO., U. S. A.

El Anti-Rabbit IgG, Biotin Conjugated (Goat) corresponde a un anticuerpo anti-IgG de conejo, que reconoce tanto a las cadenas pesadas y livianas de la molécula de inmunoglobulina, es producido en cabra y conjugado con biotina. Se obtuvo de Pierce, Rockford, Illinois 61105, U. S. A.

El suero policlonal *Anti-Renibacterium salmoninarum*, producido en conejo fue proporcionado por la Unidad de Ictiopatología de la Universidad Austral de Chile.

El Anticuerpo monoclonal biotilado, específico para el antígeno p57 se obtuvo de Diag Xotic Inc. 27 Cannon Road, Wilton. U.S.A.

La Streptavidin, Horseradish Peroxidase Conjugated, se utilizó para amplificar la reacción antígeno-anticuerpo a través de la unión altamente específica entre la biotina y la streptoavidina. Se obtuvo de Pierce, Rockford, Illinois 61105, U. S. A.

4.3.2. Kit de ELISA comercial

K-Dtect® (*Renibacterium salmoninarum* Antigen Test Kit), es un ELISA basado en anticuerpos monoclonales contra el antígeno p57 de *R. salmoninarum*. Se obtuvo de Diag Xotics Inc. USA.

4.4. SISTEMA DE IDENTIFICACIÓN BACTERIANA

Se empleó el sistema de investigación de actividades enzimáticas API-ZYM, para confirmar la pureza de los cultivos renibacterianos. Se obtuvo de Bio Mériux S. A., 68280, Marcy Etoile-France.

4.5. EQUIPOS

- Estufa de cultivo Köttermann.
- Centrífuga Heraeus Sepatech.
- Centrífuga Hettich, Universal 2S.
- Estufa de cultivo de CO₂ Thermolyne, Tipo 153300 (Compact CO₂ Series 5000).
- Cámara de flujo laminar Steag.
- Baño termostático Köttermann.
- Balanza analítica Ohaus.
- Microscopio óptico Ohaus.
- Microscopio invertido Jürgens.
- Espectrofotómetro UV-120-02 Shimadzu.
- Lector de ELISA, Dynatech 5000.
- Lavador de placas de ELISA, Dynatech Ultrawash Plus.
- Refrigerador.
- Set de micropipetas Eppendorf.

4.6. MÉTODOS

4.6.1. Cultivo de *Renibacterium salmoninarum*

La ampolla liofilizada de *R. salmoninarum* fue reconstituida en suero fisiológico estéril y luego se inoculó en caldo de cultivo KDM. El resto de la suspensión bacteriana se trasladó a viales Protect® (STC, The Rope Walk, Schofield Street, Heywood Lancashire, Gran Bretaña) para su criopreservación a -20° C.

Luego, cuando el caldo mostró turbidez, lo que es indicativo de crecimiento bacteriano, se extrajeron 200 µl de caldo y fueron inoculados en placas con agar KDM-2. Después, cuando se observó crecimiento de colonias con características similares a las descritas para *R. salmoninarum* se procedió a determinar la pureza del cultivo, para lo que se efectuaron algunas pruebas, como la tinción de Gram, catalasa, oxidasa y finalmente la determinación de las actividades enzimáticas de la bacteria mediante el sistema API-ZYM (Anexo N° 3). Adicionalmente, las colonias sospechosas se inocularon en agar TSA y se incubaron por 48 hrs a 22° C. La ausencia de crecimiento bacteriano en este último medio comprueba la pureza del cultivo ya que *R. salmoninarum* no crece en TSA, pero si lo hacen la gran mayoría de las bacterias contaminantes.

4.6.2. Preparación del control positivo

Cultivos puros de *R. salmoninarum* que crecieron en agar KDM-2 fueron cosechados en 10 ml de PBS estéril. La suspensión bacteriana se centrifugó a 3500 rpm por 10 minutos a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y el pellet se lavó con 45 ml de PBS estéril, seguido de otra centrifugación similar a la anterior. El pellet resultante se resuspendió en 10 ml de PBS estéril y luego se procedió a inactivar la bacteria por calor mediante un baño termostático a 60° C por 60 min. Para confirmar la inactivación y pureza del patógeno, se sembraron dos placas de agar KDM-2 y dos de TSA con la suspensión bacteriana inactivada y se incubó como es habitual para *R. salmoninarum*. Se ajustó la concentración de bacterias del resto de la suspensión mediante un espectrofotómetro, teniendo en cuenta que una densidad óptica (DO_{610}) igual a 1.0 equivale aproximadamente a 1×10^9 células/ml (ó $DO_{610} = 0,210$, equivalen a 1×10^8 células/ml). Luego se agregó timerosal y sero-albúmina bovina (BSA) hasta alcanzar una concentración total de 0,01 % (p/v) y 1% (p/v) respectivamente. Finalmente la suspensión se alicuotó en tubos Eppendorf y se congeló a -20° C hasta su uso (Farías, 1995).

4.6.3. Cultivo de hibridomas

Los hibridomas fueron producidos y cultivados originalmente en el medio DMEM (Dulbecco's modified Eagle médium), suplementado con penicilina-estreptomicina, L-Glutamina y ácido pirúvico; en una estufa de incubación con 5% de CO₂ y una temperatura de 37° C. Sin embargo cuando llegaron a Chile, se cultivaron temporalmente en medio RPMI con "feeder cells", las cuales son células esplénicas provenientes de ratón que condicionan el medio, ésto debido a la falta del medio original y al mal desarrollo que presentaban las células. Luego de alcanzar una densidad celular apropiada (aproximadamente 500.000 células/ml) se congelaron y criopreservaron en nitrógeno líquido según se describe en el anexo N° 4 .

Los hibridomas fueron revisados periódicamente en un microscopio invertido para monitorear su desarrollo. Cuando la mayor parte de la superficie se veía cubierta por las células (aproximadamente cada 5 días), se efectuaba un traspaso de 1 ml del contenido de la botella a una nueva, mientras a la original se le agregaban 10 ml de medio DMEM sin suero fetal y se mantenían en la estufa hasta que morían.

La cosecha de los anticuerpos monoclonales se efectuó recuperando el medio de cultivo en tubos de centrífuga y pelleteando las células por 10 minutos a 1500 rpm en una centrífuga. Se recuperó el sobrenadante el cual se congeló a -20° C de inmediato .

4.6.4. Manejo de muestras biológicas para ELISA

Las muestras de tejido renal se encontraban congeladas a - 20° C, antes de procesarlas fueron descongeladas. En la forma más aséptica posible, se extrajo lg de tejido

renal y se maceró con 1 ml de buffer de extracción (ver en anexo N° 5). La suspensión resultante se traspasó a un tubo de centrifuga y se centrifugó por 5 minutos a 3000 rpm. Finalmente se recuperó el sobrenadante y se congeló hasta su uso.

4.6.5. Evaluación de la producción de anticuerpos monoclonales mediante ELISA

Una vez cosechados los sobrenadantes de los hibridomas, se determinó el nivel de producción de anticuerpos, para lo cual se utilizó la técnica descrita por Adams y Thompson (1994), la cual se basa en el ensayo inmuno-enzimático (ELISA). A continuación se describirá la técnica empleada, todos los reactivos están descritos en el anexo N° 5.

Las placas de ELISA de 96 pocilios (Polysorp, Nunc³) fueron sensibilizadas con *R. salmoninarum* entera, inactivada por calor. Para ello se agregó 100 µl de buffer de cobertura conteniendo 0,05 % (v/v) de poli-L-lisina en cada pocilio y se incubó por 60 minutos a temperatura ambiente. Se lavó la placa 2 veces con buffer salino bajo, se adicionaron 100 µl de la suspensión bacteriana equivalente al patrón de la escala 5 de Me Farland (Bio Mériux) y se incubó la placa toda la noche a 4° C. Posteriormente se agregó 50 µl de glutaraldehído en PBS al 0,05 % (v/v) e incubó al menos por 20 minutos a temperatura ambiente. La placa se lavó 3 veces con buffer salino bajo y luego se bloqueó con 250 µl por pocilio con una solución de sero-albúmina bovina al 1 % (p/v), o con una solución de caseína al 3 % (p/v), seguido de incubación por 2 horas a temperatura ambiente. Se lavó 3 veces con buffer salino bajo, se adicionaron 100 µl por pocilio del sobrenadante de los hibridomas y se incubó por 60 minutos a temperatura ambiente. La placa se lavó 5 veces con buffer salino alto. Se añadió 100 µl por pocilio de HRP-Anti Mouse IgG (o HRP-Anti Mouse IgM), diluído 1/1000 en buffer salino bajo conteniendo 10% (v/v) de suero fetal bovino. Después de incubar por 60 minutos a temperatura ambiente se lavó la placa 5 veces con buffer salino alto, e incubó con 100 µl de cromógeno diluido en buffer substrato por 10 minutos a temperatura ambiente. La reacción se detuvo al adicionar 50 µl de solución "stop". La placa se leyó en un lector de ELISA, con un filtro de 450 nm.

Se consideran como hibridomas con una producción de anticuerpos monoclonales buena para el diagnóstico inmunoenzimático, aquellos cuya lectura promedio corresponda a una absorbancia mayor a 0,6. Bajo este valor, la producción de anticuerpos no satisface los requerimientos mínimos como para ser utilizado en la prueba de ELISA (Farías, 1995).

4.6.6. Test ELISA sandwich

Para esta técnica, las placas de ELISA (Maxisorb, Nunc) fueron sensibilizadas con un antisuero policlonal anti- *R. salmoninarum* (título 1: 4.096), el cual se diluyó en buffer de cobertura (1/1000) e incubó toda la noche a 4° C. Después de lavar con buffer bajo salino se agregó 100 µl de la muestra sospechosa (sobrenadante de tejido renal o control

³ Nunc S. A. Kamstrupvej 90 - P. O. Box 280, Dk 4000 Roskilde-Dinamarca.

positivo) y se incubó por 1 hora. Se lavó en buffer salino alto seguido de incubación con el sobrenadante de hibridoma por 1 hora. Se lavó y se incubó con IgG de oveja anti IgM de ratón (μ -chain specific) conjugado con biotina por 1 hora. Luego se lavó y se incubó por 30 minutos con Streptavidina conjugada con peroxidasa. El revelado de la peroxidasa y la lectura de la reacción se efectuó como se describe en la sección 4.6.5.

Todas las pruebas se realizaron por triplicado y se obtuvo el promedio de las absorbancias registradas.

4.6.7. Comparación entre los kit de ELISA/UACH y el K-Dtect®

El test de ELISA estandarizado en el presente trabajo (ELISA/UACH) se comparó con el kit comercial K- Dtect®. Las muestras de tejido procesadas en la sección 4.6.6. fueron sometidas a estos dos kits diagnósticos. Todos los análisis se realizaron en triplicado.

Otro estudio comparativo efectuado, fue el realizar el test según el protocolo desarrollado en este trabajo variando solamente el anticuerpo monoclonal específico. Para esto se utilizó el Ac monoclonal 11D11 y un Ac. monoclonal-biotinilado *Anti-R. salmoninarum* de origen comercial (Diag Xotics Inc, USA). Además también se observó la sensibilidad de ambos anticuerpos frente a antígenos purificados de *R. salmoninarum*, los cuales fueron proporcionados por el Dr. Carlos Farías (Tabla N° 2). Estos antígenos se encontraban liofilizados por lo cual fueron reconstituidos en buffer de extracción en el momento de su utilización.

Tabla N° 2. Antígenos purificados de *Renibacterium salmoninarum*

ANTÍGENO	CONCENTRACIÓN
Proteína de 57 kDa	200 ng/ml
Productos extracelulares PM > 30kDa	3,21 mg/ml

4.6.8. Determinación de reacción cruzada.

Con el propósito de comprobar que no había reacción cruzada por parte del anticuerpo monoclonal, se cultivaron varias bacterias de importancia en el diagnóstico diferencial de BKD o que son patógenos de importancia en la salmonicultura. Luego fueron cosechadas en suero fisiológico estéril. Esta suspensión bacteriana fue inactivada mediante calor (60° C por 1 hora) y finalmente se estandarizó a una concentración equivalente al patrón 5 de la escala de Mc Farland (Bio Mériux), diluida en buffer de extracción. A continuación estas suspensiones se probaron como muestras en el ELISA desarrollado en este trabajo.

Las especies bacterianas que se incluyeron en el estudio fueron : *Aeromonas salmonicida*, *Carnobacterium piscícola*, *Corynebacterium sp.*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomona sp.* y *Yersinia ruckeri*.

4.6.9. Determinación del punto de corte (cutoff) y comparación estadística

En el caso del ensayo inmuno-enzimático estandarizado en este trabajo, al promedio de las absorvancias obtenidas de las muestras de tejido renal, se les restó la absorvancia promedio del buffer de extracción. A continuación el promedio de las absorvancias del control sano (tejido renal negativo a BKD, previamente chequeado con un ELISA comercial), se multiplicó por tres y ese valor correspondía al punto de corte que diferenciaba entre una muestra positiva de una negativa.

Para el ELISA comercial se calcula una curva estándar. Esto se hizo obteniendo los promedios de todas las absorvancias de los controles y muestras; y se les restó el promedio de las absorvancias del buffer de extracción. A continuación se granearon los valores de los controles (los cuales tienen una concentración de antígeno determinada) en un gráfico que en el eje de las abscisas indica la concentración del antígeno en ng/ml y en el eje de las ordenadas ubica las absorvancias a una DO_{410} nm . Luego se ubica el promedio de las absorvancias de la muestra y se traza una vertical hacia el eje de la abscisas y se obtiene la concentración del antígeno para esa muestra de tejido renal. Para interpretar los resultados se indica que una concentración menor a 6 ng/ml se considera como negativa. Sobre los 10 ng/ml la muestra se considera positiva para BKD. Valores intermedios son considerados como sospechosos.

En el anexo N° 6 se encuentra el diseño de la distribución de las muestras en la placa de ELISA utilizados por el kit UACH y K-Dtect® .

Los resultados de este estudio comparativo fueron sometidos al Test de Chi-Cuadrado de Me Nemar para diferencias entre dos proporciones correlativas, el cual indica que si el valor de chi-cuadrado es menor a 3,84; no habría una diferencia estadística significativa entre ambos ELISAs ($p > 0,05$). Para los cálculos estadísticos las muestras sospechosas fueron tomadas como positivas (Remington y Schork, 1970).

5. RESULTADOS

5.1. Cultivo y determinación de las actividades enzimáticas de *Renibacterium salmoninarum* cepa ATCC 33209

El cultivo de la bacteria se realizó en agar KDM-2, según se describe en la sección 4.1.1. y 4.6.1. Luego de 15 días de incubación, se observó el crecimiento de colonias de color blanco grisáceo y de 1 mm de diámetro en promedio. El análisis morfológico de las colonias sospechosas, mediante la tinción de Gram, evidenció que estas colonias estaban constituidas por pequeños diplobacilos fuertemente Gram positivos. Posteriormente al someterlas a la prueba de catalasa se produjo una reacción positiva, mientras que con la prueba de la oxidasa el resultado fue negativo. No se observó crecimiento bacteriano en agar TSA después de 48 hrs. de incubación a 22 °C. La caracterización bioquímica se realizó mediante el test API ZYM. La tabla N°5 muestra los resultados de este análisis. Se incluye en la tabla el patrón obtenido por otros autores utilizando el mismo aislado bacteriano.

Tabla N° 5. Caracterización enzimática de *Renibacterium salmoninarum* ATCC 33209 mediante el test API ZYM y comparación con similar cepa reportada por Sakai y col. 1993 .

ENZIMA INVESTIGADA	ACTIVIDAD ENZIMATICA		
	Concentración (nM/ml)	Resultado	SAKAI Y COL, 1993
Fosfatasa alcalina	20	+	+/-
Esterasa (C1)	5	+	+/-
Esterasa lipasa (C8)	10	+	+
Lipasa (14)	0	-	-
Leucina arilamidasa	10	+	+
Valina arilamidasa	0	-	-
Cistina arilamidasa	0	-	-
Tripsina	10	+	+/-
α -Quimotripsina	0	-	-
Fosfatasa acida	40	+	+
NaftoI-A-S-BI-fosfohidrolasa	10	+	+/-
α -Galactosidasa	0	-	-
β -Galactosidasa	0	-	-
β -Glucoronidasa	0	-	-
α -Glucosidasa	40	+	+
β -Glucosidasa	0	-	-
N-acetil- β -Glucosaminidasa	0	-	-
α -Manosidasa	5	+	+
α -Fucosidasa	0	-	-

Como se aprecia en la tabla N° 5, el perfil enzimático de la bacteria cultivada, coincide plenamente con el de la cepa ATCC 33209 de *R. salmoninarum* reportado por Sakai y col., (1993), ésto en conjunto con los resultados previos, confirmó la obtención de cultivos puros del patógeno.

5.2. Cultivo de hibridomas y obtención de anticuerpos monoclonales

Las siete líneas de hibridomas utilizados (ver sección 4.1.2.) fueron cultivadas inicialmente en RPMI. Los resultados del análisis efectuado a los sobrenadantes, mediante ELISA se muestran en el gráfico N° 1.

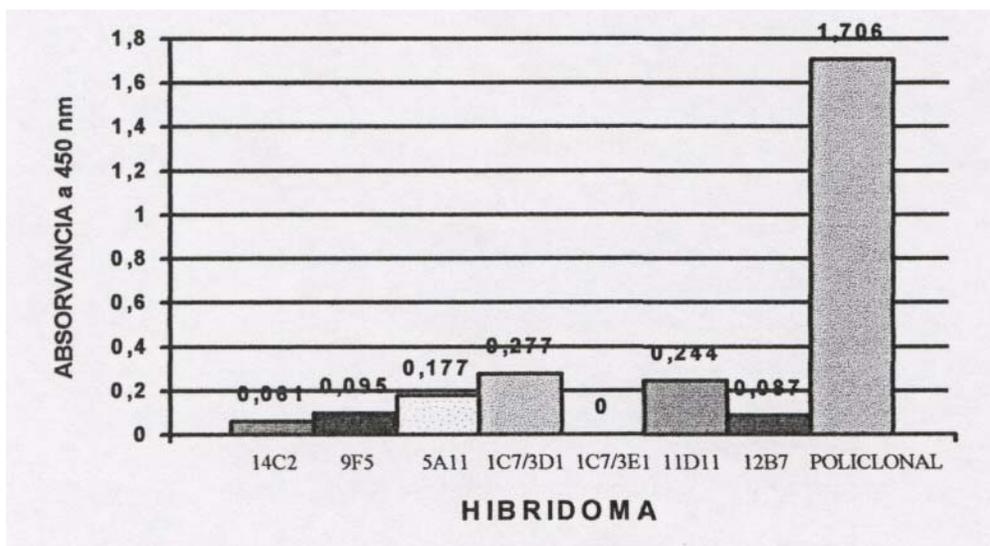


Gráfico N°1. Absorvancias de los sobrenadantes provenientes de los distintos hibridomas cultivados en RPMI, determinadas mediante ELISA indirecto.

Como se puede apreciar en el gráfico anterior, ninguno de los hibridomas analizados alcanzó una absorvancia de 0,6; lo que sugiere que los hibridomas en estudio no sintetizaron anticuerpos monoclonales.

Debido a la falta de producción de anticuerpos por parte de los hibridomas, se decidió cultivar las células en el medio de cultivo en el que fueron originalmente producidos (DMEM). Luego que los hibridomas lograron un desarrollo celular óptimo (aproximadamente 500.000 células/ml), se obtuvo el sobrenadante y este fue sometido al test de ELISA indirecto. Los resultados se presentan en el gráfico N° 2.

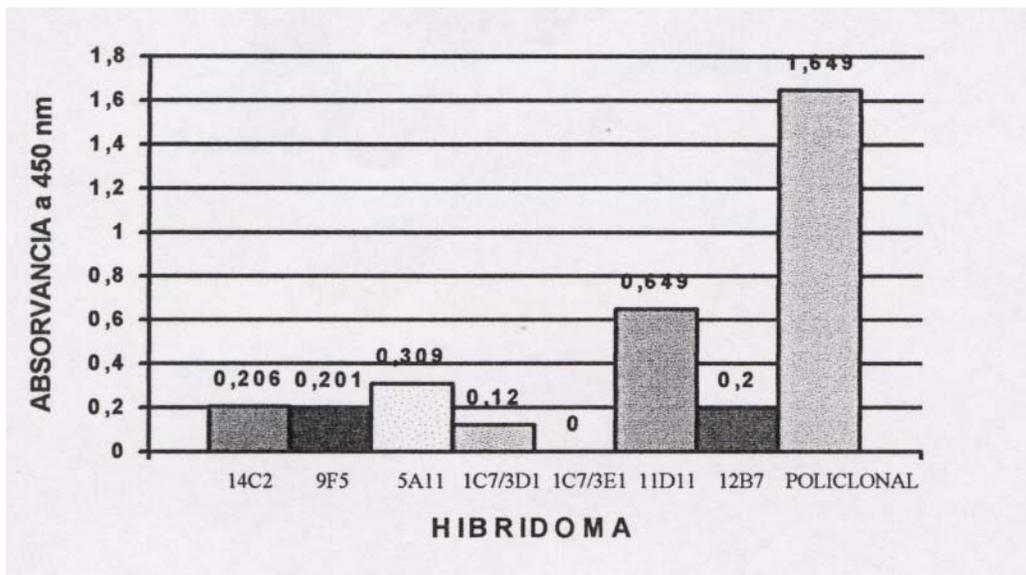


Gráfico N° 2. Absorvancias de los sobrenadantes de los distintos hibridomas cultivados en DMEM, determinadas mediante ELISA.

El gráfico anterior muestra que el único hibridoma que produce anticuerpos monoclonales es el 11D11 .

La titulación del sobrenadante 11D11 se realizó mediante ELISA indirecto amplificado con biotina-streptoavidina, según el protocolo descrito en sección 4.6.6. La máxima dilución posible de este sobrenadante para obtener una absorbancia igual o superior a 0,6; medido a 450 nm fue de 1:32 .

5.3. Estandarización de la técnica ELISA

Debido a que sólo uno de los siete hibridomas originales estaba produciendo anticuerpos, se decidió adsorber en el fondo del pocilio de la placa para ELISA un suero de conejo con anticuerpos policlonales anti-*R. salmoninarum* obtenidos desde la Unidad de Ictiopatología de la Universidad Austral de Chile. El anticuerpo monoclonal 11D11 se utilizó luego como segundo anticuerpo como se describe en sección 4.6.6. Se probaron diferentes diluciones tanto del anticuerpo policlonal, como también del monoclonal y del conjugado, hasta que se obtuvo absorbancias óptimas y uniformidad en los resultados. En la figura N° 1 se esquematiza el ensayo inmuno-enzimático con sus diferentes componentes y las concentraciones de trabajo que se concluyeron como óptimas.



Figura N° 1. Diagrama que muestra los distintos componentes del ELISA para BKD y sus concentraciones de trabajo .

5.4. Determinación de la sensibilidad

Con el propósito de determinar la mínima concentración bacteriana capaz de ser detectada por el test ELISA desarrollado en este estudio (sensibilidad), se procedió a chequear controles bacterianos de concentración conocida, cuyos resultados se presentan en el gráfico N°3.

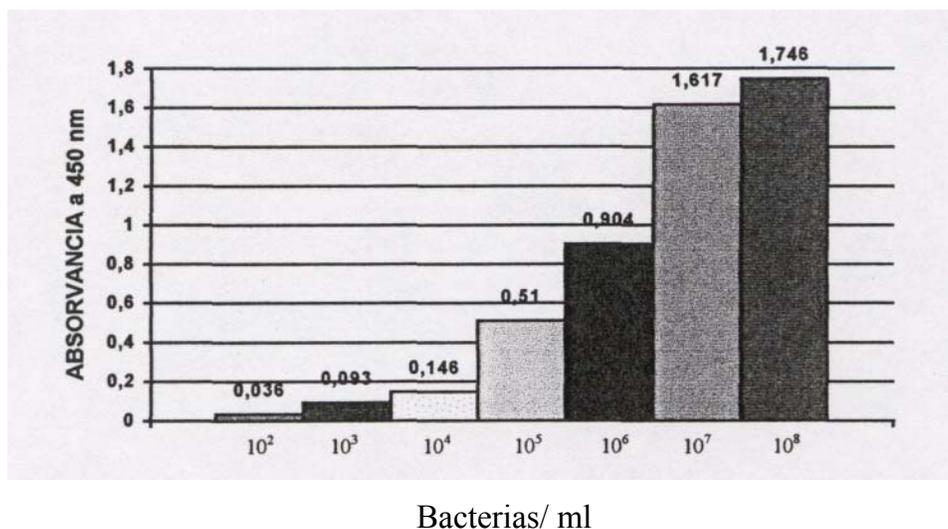


Gráfico N° 3. Sensibilidad del test ELISA utilizando diferentes concentraciones de células bacterianas/ ml.

De estos datos se concluye que el presente test ELISA puede detectar un mínimo de 10⁵ bacterias/ml.

5.5. Determinación de especificidad

El estudio de reacción cruzada se realizó utilizando cultivos bacterianos puros. Como se muestra en la tabla N° 6, se incluyeron seis patógenos bacterianos que por su frecuencia de presentación o similitud con *R. salmoninarum*, son importantes de descartar como reaccionantes al anticuerpo monoclonal en estudio. Las absorbancias originales que dieron origen a esta tabla se encuentra en el anexo N° 7. En estos datos se aprecia la ausencia de reacción cruzada del anticuerpo 11D11 con las especies bacterianas analizadas .

Tabla N° 6. ESTUDIO DE REACCIÓN CRUZADA DEL ANTICUERPO 11D11 MEDIANTE ELISA.

Bacteria	Resultado
<i>Aeromonas salmonicida</i>	-
<i>Carnobacterium piscícola</i>	-
<i>Corynebacterium sp.</i>	-
<i>Micrococcus luteus</i>	-
<i>Pseudomona sp.</i>	-
<i>Yersinia ruckeri</i>	-
<i>Renibacterium salmoninanim</i>	+

5.6. Comparación del test ELISA con un kit comercial de características similares

En la comparación del test ELISA estandarizado en este trabajo (denominado ELISA/ UACH), con un kit ELISA comercial para *R. salmoninarum*, se utilizaron 50 muestras de tejido renal sospechosos de BKD. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla N° 7 y las absorbancias que dieron origen a estos resultados se muestran en el anexo N° 8.

Tabla N° 7. Comparación entre el kit ELISA comercial y el kit ELISA/UACH en tejido renal sospechoso de BKD.

N° Muestra	ELISA comercial	ELISA UACH	N° Muestra	ELISA comercial	ELISA UACH
1	-	-	26	-	-
2	-	-	27	-	-
3	+	+	28	-	-
4	-	-	29	-	-
5	-	-	30	-	-
6	+	+	31	-	-
7	-	-	32	-	-
8	-	-	33	s	-
9	+	+	34	s	-
10	-	-	35	-	-
11	+	+	36	-	+
12	-	-	37	+	+
13	-	-	38	+	-
14	-	-	39	+	+
15	-	-	40	-	-
16	-	+	41	+	+
17	-	-	42	s	+
18	-	+	43	-	-
19	s	-	44	-	-
20	s	-	45	-	-
21	s	-	46	s	+
22	-	-	47	s	+
23	s	-	48	s	-
24	-	-	49	-	-
25	s	-	50	-	-
Totales					
Resultados	ELISA comercial		ELISA UACH		
+ = Muestra positiva	8		13		
- = Muestra negativa	31		37		
s = Muestra sospechosa	11		-		

La tabla anterior muestra similitud en los resultados de ambos ensayos inmunoenzimáticos, lo que se corroboró al someterlos a la Prueba de Chi-cuadrado según Me Nemar. El valor de $\chi^2 = 3,0$ indica que no existe una diferencia estadística significativa entre ambos test inmunodiagnósticos.

5.7. Comparación de dos anticuerpos monoclonales para la detección de antígenos de *R. salmoninarum* en muestras de riñón sospechosos de BKD mediante el test ELISA

Tomando como base el ELISA previamente estandarizado en este trabajo, se comparó la efectividad del anticuerpo monoclonal 11D11 frente a un anticuerpo monoclonal comercial anti-*R. salmoninarum*, los resultados obtenidos se presentan en la tabla N° 8 y las absorbancias que los originaron pueden verse en el anexo N° 9.

Tabla N° 8. Análisis de tejido renal sospechoso de BKD mediante el test de ELISA utilizando dos anticuerpos monoclonales diferentes.

N° Muestra	Anticuerpo comercial	Anticuerpo 11D11	N° Muestra	Anticuerpo comercial	Anticuerpo 11D11
1	+	+	26	-	-
2	+	-	27	-	-
3	-	-	28	-	-
4	+	-	29	-	-
5	-	-	30	-	-
6	-	-	31	+	+
7	-	-	32	-	-
8	-	-	33	-	-
9	+	+	34	-	-
10	-	-	35	-	-
11	+	-	36	-	-
12	-	-	37	-	-
13	-	-	38	-	-
14	-	-	39	+	-
15	-	-	40	-	-
16	-	-	41	-	-
17	-	-	42	-	-
18	-	-	43	-	-
19	-	-	44	-	-
20	-	-	45	-	-
21	-	+	46	+	+
22	-	+	47	-	-
23	+	+	48	-	-
24	-	-	49	-	-
25	-	-	50	-	-
Totales					
Resultados		Anticuerpo comercial		Anticuerpo 11D11	
+ = Muestra positiva		9		7	
- = Muestra negativa		41		43	

Al someter estos resultados al estudio estadístico, mediante la Prueba de Chi-cuadrado de Mc Nemar, el valor que se obtuvo para $\chi^2 = 0,67$; lo cual indica que no hay una diferencia estadísticamente significativa entre ambos test de ELISA, por lo tanto ambos test son homologables.

Además se compararon ambos anticuerpos monoclonales, utilizando como muestras problema antígenos purificados de *R. salmoninarum*, los valores de las absorvancias obtenidas se pueden apreciar en la tabla N° 9.

Tabla N° 9. Comparación entre el anticuerpo monoclonal 11D11 y otro de origen comercial para la detección del antígeno p57 en muestras de ECPs y p57 purificados.

Antígeno (concentración)	Absorvancia obtenida con el anticuerpo comercial	Absorvancia obtenida con el anticuerpo 11D11
Proteína p57 (20 ng)	1,068	0,659
ECP (0,321 mg)	0,732	0,686
Punto de corte	0,153	

6. DISCUSIÓN

En tan solo diez años, desde que Chile comenzó a cultivar salmón en forma comercial, ya ocupa uno de los primeros lugares en el mundo como país productor de estas especies. Esta actividad que aparece con tal potencial, puede verse afectada sino se consideran algunas limitantes propias de la explotación intensiva de salmónidos. Parte del éxito de la salmonicultura a corto o largo plazo está íntimamente relacionado con la presencia de enfermedades en los peces (Bustos, 1993).

Uno de los principales obstáculos para el desarrollo de la salmonicultura tanto nacional como mundial, es la Enfermedad Bacteriana del Riñón (BKD), causada por *Renibacterium salmoninarum* (Sanders y Fryer, 1980). Por ello es que la mejor herramienta para disminuir la incidencia y controlar el BKD es la prevención en sus distintas formas. Sin lugar a dudas, el éxito en la prevención del BKD depende de la confiabilidad que proporcionen los métodos de diagnóstico, particularmente en cuanto a su sensibilidad y especificidad.

Debido a la lentitud del cultivo y a la poca sensibilidad de las técnicas de diagnóstico más tradicionales, se han preferido las metodologías inmunodiagnósticas, de ellas se han efectuado diversos estudios comparativos para determinar la más apropiada para la detección del BKD (Dixon, 1987b; Meyers y col., 1993; White y col., 1995) en todos estos trabajos siempre se llega a la conclusión de que el ensayo inmuno-enzimático es la técnica más sensible para el diagnóstico de BKD.

Para probar una metodología diagnóstica es esencial contar con un control positivo estandarizado, en este caso un cultivo puro de *R. salmoninarum*. La ausencia de contaminación en los cultivos de *R. salmoninarum* fue determinada por técnicas microbiológicas estándares, sin embargo para corroborarlas se realizó además un estudio bioquímico basado en el test API ZYM. El patrón enzimático obtenido en esta prueba (ver tabla N° 5) coincidió plenamente con los reportados por Sakai y col., (1993) y Farías (1995) quienes utilizaron el mismo aislado bacteriano (ATCC 33209). Aún cuando existió uniformidad en el patrón enzimático, se observaron leves diferencias en cuanto a la concentración en la cual se presenta cada una de estas enzimas. Este fenómeno también fue observado por Farías (1995) en 18 aislados de *R. salmoninarum* provenientes de Gran Bretaña, Japón, E.E.U.U. y Chile.

Se ha reportado, sin embargo diferencias en el perfil enzimático dependiendo del medio de cultivo en el cual creció la bacteria (Farías, 1995). El mismo autor concluye que el medio KDM-2 y el KDM-Selectivo son superiores que el KDM-carbón y el Mueller-Hinton para este tipo de análisis. En ese estudio se determinó que cuando la bacteria se cultiva en KDM-carbón, se observa una notable reducción de la enzima butirato esterasa,

caprilato esterasa y a-glucosidasa, en tanto que cuando se cultivan en Mueller-Hinton, la actividad de la fosfatasa acida no se detecta.

En cuanto al cultivo de hibridomas, ninguna de las siete lineas celulares cultivadas originalmente sintetizó anticuerpos monoclonales, aún cuando se probó con dos tipos diferentes de medios de cultivo. Esto puede deberse a que estas células llegaron a Chile en medio de cultivo, el cual permaneció cerca de una semana a temperatura ambiente y sin CO₂. Al momento de ingresar a la Unidad de Ictiopatología, las células evidenciaban un marcado proceso degenerativo, sin embargo posteriormente se recuperaron y crecieron satisfactoriamente. Es necesario tener presente que los hibridomas son células híbridas, por lo cual es normal que pierdan cromosomas, lo cual puede modificar la especificidad del anticuerpo, cambiar el tipo de cadena de la inmunoglobulina o incluso hacer que la célula y sus descendientes pierdan la capacidad de sintetizar el anticuerpo monoclonal (Milstein y Köhler, 1975). Por lo mismo, es poco probable que lo anterior le suceda a 6 hibridomas al mismo tiempo.

El segundo set de hibridomas recibidos desde Escocia, mostró una marcada mejoría en el aspecto de las mismas. En esta ocasión, la línea celular 11D11 se identificó como productora de anticuerpos, los cuales se utilizaron en este estudio. En un posterior envío de células se recibió el hibridoma 1C7/3D1, el cual se encuentra actualmente sintetizando anticuerpos pero que no fue incluido en esta investigación debido al avanzado estado de desarrollo en el que ésta se encontraba.

Originalmente, en este estudio se pretendió desarrollar un test ELISA tipo sandwich basado en dos anticuerpos monoclonales. Uno de ellos iría adosado a la placa de 96 pocilios y el otro se utilizaría como segundo anticuerpo específico. Sin embargo, y debido a que sólo una línea celular fue apta para la síntesis de anticuerpos, se debió modificar el diseño inicial y sensibilizar las placas de 96 pocilios con un antisero policlonal *Anti-R. salmoninarum*. Aún cuando el diseño clásico del ELISA tipo sandwich utiliza dos anticuerpos monoclonales (Dixon, 1987a; Hsu y col., 1991; Pascho y Mulcahy, 1987), existen buenos ejemplos de la efectividad de usar una combinación de anticuerpos poli y monoclonales en este tipo de pruebas. Al respecto, Adams (1996)⁴, acaba de desarrollar un test ELISA, para la detección de tuberculosis en peces, utilizando una combinación de anticuerpos poli y monoclonales similar a la descrita en el presente trabajo.

Debido a que el anticuerpo 11D11 pertenece al isotipo IgM (Fariás, 1995) y que el suero policlonal está formado principalmenet por inmunoglobulinas del tipo G (Folch, 1996)⁵ fue posible estandarizar un ELISA de tipo sandwich, en que el antígeno es capturado por los anticuerpos policlonales (IgG) y luego es marcado por el anticuerpo monoclonal (IgM). El complejo anticuerpo-antígeno-anticuerpo es posteriormente identificado

⁴ Comunicación personal, Universidad de Stirling, Escocia.

⁵ Comunicación personal, Universidad Austral de Chile.

mediante una antiglobulina específica para la cadena μ de la IgM.

El uso de anticuerpos policlonales en ELISA ha sido cuestionado, debido a la existencia de reacción cruzada con otras bacterias (Turaga y col., 1987), pero en este trabajo la función que cumplen es sólo la de captar a los antígenos, en tanto que el anticuerpo que confiere la especificidad y sensibilidad es el monoclonal. Este anticuerpo (11D11) reconoce un epítipo común a la proteína p57 y al peptidoglicano de la pared celular de la bacteria, lo cual proporciona una ventaja importante frente a los kits comerciales, que se basan en anticuerpos monoclonales específicos sólo para la p57. Existen evidencias que sugieren que los niveles de esta proteína pueden ser afectados por los tratamientos con eritromicina que habitualmente reciben los reproductores, por las proteasas liberadas al macerar el tejido renal (Barrientos, 1995), como también por temperaturas ambientales superiores a 15° C. Por lo tanto al descender los niveles de este antígeno, estos anticuerpos pierden sensibilidad, mientras que el anticuerpo monoclonal 11D11 aún puede unirse al peptidoglicano de la pared celular bacteriana.

Para desarrollar un ensayo inmuno-enzimático es importante la elección de la microplaca a utilizar. Pascho y Mulcahy (1987) probaron varios tipos de microplacas existentes en el mercado y finalmente determinaron que la Maxisorb (Nunc) era una de las mejores por la adecuada adherencia del anticuerpo a la superficie del pocilio y que posteriormente los niveles de unión inespecífica o background al fondo del pocilio eran mínimos.

Un punto importante a mencionar es la rapidez de esta técnica en relación a otras metodologías inmunodiagnósticas (Dixon, 1987b). Por ejemplo, una vez preparada la microplaca para el ensayo inmuno-enzimático realizado en este trabajo, toda la técnica demora alrededor de 4 horas; o sea en ese lapso de tiempo se pueden chequear 29 o 45 muestras, dependiendo si se testean por duplicado o por triplicado.

Una vez estandarizado el ELISA desarrollado en este trabajo, se efectuó una prueba, en la cual se utilizaron controles bacterianos de concentración conocida (10^2 a 10^8 bacterias/ml) para determinar el grado de sensibilidad del ensayo. Como se aprecia en el gráfico N° 3, el ELISA pierde sensibilidad cuando la concentración bacteriana es menor a 10^5 bacterias/ml. Esto se puede comparar con los resultados obtenidos por Bandín y col., (1996) quienes con respecto a la sensibilidad de los ensayos inmuno-enzimáticos comerciales determinaron que estos detectaban en forma consistente los antígenos de *R. salmoninarum* solamente en muestras con una cantidad mayor a 10^6 bacterias/g de tejido.

Un problema con los estudios sobre los test de ELISA para detectar *R. salmoninarum*, es que la mayoría han utilizado antígenos extraídos de cultivos *in vitro* (Dixon, 1987b; Pascho y Mulcahy, 1987), pero no los han evaluado directamente con muestras biológicas provenientes de los peces, este hecho resta veracidad a las pruebas ya que lo ideal es someter la técnica en estudio a las condiciones prácticas en que será utilizada (Rockey y col. 1991).

Otro punto en discusión corresponde a cuál es la muestra óptima, según Griffiths y col. (1991b), el tejido renal es el que otorga la mayor posibilidad de detectar a *R. salmoninarum*. Posteriormente, el mismo autor plantea que también el fluido ovárico corresponde, junto al tejido renal, la muestra más apropiada para determinar la presencia de la bacteria (Griffiths y col., 1996).

De la tabla N° 7 se desprende que no existió una diferencia estadísticamente significativa entre el test ELISA/UACH y el K-Dtect® cuando éstos fueron aplicados a 50 muestras de tejido renal provenientes de peces sospechosos de BKD. Este hecho permite concluir que ambos test son homologables en cuanto a su sensibilidad para detectar el patógeno. Sin embargo, se apreciaron algunas diferencias, como por ejemplo que con el test K-Dtect® se detectaron 11 muestras sospechosas, de las cuales solamente 3 fueron detectadas como positivas por el ELISAAJACH. En todo caso el mismo fabricante del kit comercial recomienda repetir el test cuando la muestra resulte sospechosa. No es habitual una proporción tan alta (22 %) de resultados sospechosos, el problema con ellos es que para la metodología de Chi-cuadrado según Mc Nemar se debieron considerar como positivas (Remington y Schork, 1970), lo que produjo un aumento en el valor de χ^2 , el cual de todas maneras fue inferior a 3,84.

Otra diferencia está relacionada con los niveles de las absorvancias, las cuales se pueden apreciar en el anexo N° 8, en el caso del ELISA/UACH, éstas fueron bastante uniformes, mientras que en el ELISA comercial, con el tiempo, los puntos de corte varían mucho, esto sobre todo cuando se utilizan los "bulk pack" (kits que contienen 10 microplacas y sus respectivos reactivos envasados cada uno en la cantidad necesaria para el desarrollo de los 10 ensayos). En este caso los niveles de las absorvancias de los controles al comienzo son muy altos, por lo tanto elevan el punto de corte para determinar la positividad de las muestras, por lo que muchas veces las absorvancias altas resultan solamente sospechosas o negativas. Posteriormente al transcurrir el tiempo las absorvancias de los controles positivos van disminuyendo y con ellas el punto de corte. Esto corrobora lo expuesto por Bandín y col. (1996), quienes establecen que aún quedan muchos aspectos por mejorar en estos kits comerciales.

En la tabla N° 8 se registran los resultados obtenidos al comparar la eficiencia del anticuerpo monoclonal 11D11, con la de un anticuerpo monoclonal comercial (Diag Xotics) para detectar antígenos de *R. salmoninarum*. Se puede apreciar que la diferencia entre la cantidad de muestras positivas es mínimo y que el valor para $\chi^2 = 0,67$ es muy bajo, indicando que no hay diferencia estadística significativa entre ambos ensayos, lo cual se puede extrapolar a la capacidad para captar antígenos renibacterianos en muestras biológicas. Sin embargo, llama la atención el hecho que en 6 muestras la positividad fue determinada por uno sólo de los anticuerpos, y no por ambos, lo que nos recuerda que el epítotope al cual se unen estos anticuerpos es distinto, en el caso del anticuerpo comercial es específico de la proteína p57, mientras que en el caso del 11D11 es común tanto para la proteína p57 como para el peptidoglicano de la pared celular bacteriana.

Posteriormente se utilizaron antígenos purificados de *R. salmoninarum* para determinar las absorbancias, y con ello el grado de avidéz para captarlos por parte del anticuerpo monoclonal 11D11 y por el anticuerpo comercial. La tabla N° 9 ratifica el comentario previamente hecho con respecto a la afinidad por su epítoto que tiene cada anticuerpo monoclonal. En el caso del anticuerpo comercial existe una gran diferencia entre la absorbancia obtenida por la proteína p57 y la que se obtuvo para los productos extracelulares, de los cuales la p57 también forma parte. En cambio para el anticuerpo 11D11, si bien las absorbancias fueron menores, existió uniformidad en cuanto a sus valores.

Es importante hacer mención de la superioridad de los ensayos inmunoenzimáticos basados en anticuerpos monoclonales, frente a los policlonales, ya que cuando se utilizó 20 ng de proteína p57 como antígeno, las absorbancias obtenidas fueron 1,068 para el anticuerpo comercial y de 0,659 para el anticuerpo 11D11; mientras que para Pascho y Mulcahy (1987) fue de 0,100 al usar un ELISA basado sólo en anticuerpos policlonales.

Al efectuar una prueba de determinación de reacción cruzada por parte del ELISA estandarizado en este trabajo, como se puede apreciar en la tabla N° 6, ninguna de las bacterias sometidas al ensayo dio reacción cruzada. De especial importancia son los resultados con *Carnobacterium piscícola* y *Corynebacterium sp.* de las cuales ya se tienen antecedentes de reacción cruzada con distintos sueros policlonales *Anti-R. salmoninarum* (Wood y col., 1995) y también el resultado de *Micrococcus luteus* el cual presentó el grado mínimo de reacción cruzada (< 20% de inmuno-reactividad) cuando el anticuerpo 11D11 fue sometido por su creador a una prueba de reacción cruzada frente a 30 especies bacterianas (Fariás, 1995).

La ineficiencia de las medidas quimioterapéuticas para prevenir y controlar la enfermedad y la falta de una vacuna efectiva, hacen evidente que la mejor manera de controlar el BKD es detectando a los individuos enfermos, tanto clínicamente como también a los portadores asintomáticos y evitar que éstos infecten al resto de la población principalmente a través de la vía vertical (Solar y Evelyn, 1991). Un pilar fundamental para disminuir la transmisión a través de las ovas es el chequeo sanitario o screening de los reproductores hembra, para lo cual actualmente, en la práctica la mejor herramienta diagnóstica es la técnica de ELISA. Se ha visto que en grupos de peces provenientes de madres con altos niveles de *R. salmoninarum* según el test de ELISA, se presentaron mortalidades cercanas al 85 % al ser transferidos al mar. Mientras que las pérdidas han sido mínimas en los desendientes de madres que según el ELISA tenían una baja carga antigénica (Elliot y col., 1995).

Uno de los objetivos del presente trabajo fue brindar una nueva alternativa en el diagnóstico de la Enfermedad Bacteriana del Riñón, la cual posee un protocolo estandarizado para nuestra realidad, condición fundamental que según Klempau y Smith (1993) muchas veces no se cumple.

En un futuro próximo se planea estandarizar el test de PCR como técnica de uso masivo, ya que corresponde a la técnica diagnóstica más sensible para BKD descrita hasta hoy. Sin embargo, por el momento su uso está limitado a los laboratorios especializados debido a su complejidad y alto costo. Por ello, el PCR se mantiene como una prueba confirmativa de última elección.

De los resultados obtenidos en el presente estudio, se concluye que:

- El hibridoma 11D11 posee un nivel de producción de anticuerpos monoclonales suficiente, para ser utilizado como componente de un ensayo inmuno-enzimático (ELISA) para el diagnóstico de *Renibacterium salmoninarum* .
- La sensibilidad del ensayo inmuno-enzimático (ELISA) desarrollado en este trabajo en base al anticuerpo monoclonal 11D11, es homologable a la del Kit comercial K-Dtect® de Diag Xotics para la detección de *Renibacterium salmoninarum* .
- El ensayo inmuno-enzimático (ELISA) desarrollado en este trabajo en base al anticuerpo monoclonal 11D11, es específico para la detección de *Renibacterium salmoninarum*.

7. BIBLIOGRAFÍA

Adams, A. 1992. Sandwich enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) to detect and quantify bacterial pathogens in fish tissue . *Techniques in fish immunology* . pp. 177-184.

Adams, A., K. Thompson. 1994. Monoclonal antibody workshop manual. Institute of Aquaculture, University of Stirling. Escocia.

Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, J. Watson. 1994. *Molecular biology of the cell*. 3° ed., Garland Publishing, NY and London.

Alton, G., L. Jones, R. Angus, J. Verger. 1988. *Techniques for the brucellosis laboratory*. INRA, París. Citado por **Meléndez, R.** 1993. Evolución de anticuerpos detectados mediante ELISA, en terneras vacunadas en forme tradicional con *Brucella abortus*, cepa 19. Tesis para optar al Título Profesional de Médico Veterinario en la Escuela de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. Universidad de Chile, Santiago, Chile.

Austin, B., J. Raymont. 1985. Epizootiology of *Renibacterium salmoninarum*, the causal agent of Bacterial Kidney Disease in salmonid fish . *Journ. Of Fish Dis.* 8: 505-509.

Austin, B., D. Austin. 1987. Bacterial fish pathogens: disease in farmed and wild fish. pp. 70-87.

Austin, B., T. Embley, M. Goodfellow. 1993. Selective isolation of *Renibacterium salmoninarum* . *FEMS. Microbiol. Lett.* 17: 111-114.

Bandin, Y., P. Heinen, L. Brown, A. Toranzo. 1996. Comparison of different ELISA kits for detecting *Renibacterium salmoninarum* . *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 16 : 19-22 .

Barrientos, J. 1995. Comparación de las técnicas de Inmunofluorescencia indirecta (IFAT), Inmunoensayo enzimático (ELISA) y Tinción de Gram, para el diagnóstico de la Enfermedad Bacteriana del Riñón (BKD) en salmón del Atlántico (*Salmo salar*) .Tesis de Tecnología Médica, Universidad Austral de Chile, Facultad de Medicina, Valdivia, Chile .

Bruno, D. 1986. Histopathology od Bacterial Kidney Disease in laboratory infected rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and Atlantic salmón (*Salmo salar*), with reference to naturally infected fish . *Joun. Fish Dis.* 9 : 523-537 .

Bruno, D. 1990. Presence of a saline extractable protein associated with virulent strains of the fish pathogen *Renibacterium salmoninarum* . *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 10:8-10.

Bullock, G., M. Stuckey. 1975. Fluorescent antibody identification and detection of the *Corynebacterium* causing Kidney disease of salmonids. Jour. Fish Res. Board Can. 32: 2224-2227.

Bullock, G., B. Griffin, H. Stuckey. 1980. Detection of *Corynebacterium salmoninus* by Direct fluorescent antibody test. Can. J. Fish Aquat. Sci. 37: 719-721.

Bullock, G., R. Hermán. 1988. Bacterial Kidney Disease of salmonid fishes caused by *Renibacterium salmoninarum*. Fish and Wildlife Service, Research and development, Washington, DC.

Bustos, P., 1993. Pérdidas por enfermedades bacterianas de salmónidos en Chile. Agua Noticias Int. 19:4-13.

Butendieck, B., P. Morales, J. Figueroa, M. Concha, G. León. 1995. Detección de *Renibacterium salmoninarum* por amplificación génica específica. Arch. Med. Vet. XXVII, 2: 46-54.

Campos, H., J. Arenas, W. Steffen. 1980. Perspectivas de desarrollo de cultivo e industrialización de especies dulce acuícolas en Chile. Análisis de los recursos hídricos de la Décima Región de Chile. Proyecto Corfo. Universidad Austral de Chile.

Campos, M. 1996 Desarrollo de la acuicultura en Chile. Agua Noticias Int. 33: 8-13.

Cipriano, R, C. Starliper, J. Sharte. 1985. Comparative sensitivities of diagnostic procedures used to detect Bacterial Kidney Disease in salmonid fishes. Jour. of Wild. Dis. 21:211-218.

Cortes, C. 1994. Generación, expansión, purificación y caracterización de un anticuerpo monoclonal anti pili K99 (F5) de *Escherichia coli* enteropatógena. Tesis para optar al Título Profesional de Médico Veterinario en la Escuela de Ciencias Veterinarias y pecuarias. Universidad de Chile, Santiago, Chile.

Chen, P., G. Bullock, M. Stuckey, A. Bullock. 1974. Serological diagnosis of Corynebacterial Kidney Disease of salmonids. J. Fish Res. Board Can. 31: 1939-1940. Citado por **Sakai, M., S. Atsuta, M. Kobayashi.** 1989. Comparison of methods used to detect *Renibacterium salmoninarum*, the causative agent of Bacterial Kidney Disease. J. Fish Dis. 10:229-231.

Daly, J., R Stevenson. 1990. Characterization of the *Renibacterium salmoninarum* haemoagglutinin. J. Gen. Microbiol. 136: 949-953.

Dinter, Z. 1989. Diagnostic virology. Coordinated research programe on animal disease diagnostics. FAO/IAEA/SIDA/. pp. 24-34. Citado por **Vargas, M.** 1992. Detección de la respuesta humoral mediante ELISA en bovinos revacunados con *Brucella abortus* cepa 19.

Tesis para optar al Título Profesional de Médico Veterinario en la Escuela de Ciencias Veterinarias y Pecuarias . Universidad de Chile, Santiago, Chile .

Dixon, P. 1987a. Detection of *Renibacterium salmoninarum* by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). J. Appl. Ichthvol. 3 : 77-82 .

Dixon, P. 1987b. Comparison of serological techniques for the identification of *Renibacterium salmoninarum*. J. Appl. Ichthvol. 3: 131-138.

Elliot, D., T. Barilla. 1987. Membrana filtration-fluorescent antibody staining antibody procedure for detecting and quantifying *Renibacterium salmoninarum* in coelomic fluid of chinook salmón (*O. tsawytschá*). Can. J. Fish. and Sci. 44: 206-216.

Elliot, D., R. Pascho, G. Bullock. 1989. Developments in the control of Bacterial Kidney Disease of salmonid fishes. Dis. Aquat. Org. 6: 201-215.

Elliot, D., R. Pascho, A. Palmisano. 1995. Broodstock segregation for the control of Bacterial Kidney Disease can affect mortality of progeny chinook salmón (*Oncorhynchus tshawytscha*) in seawater . Aquaculture 1: 133-144.

Eshar, Z. 1990. Hybridoma technology in the biosciences and medicine. De. Springer T. A. Plenum Press, New York.

Estay, F., N. Díaz, L. Valladares, G. Dazarola. 1995. Manejo reproductivo de salmónidos, pp. 15-24.

Evelyn, T., L. Prospers Porta, J. Ketcheson. 1986. Persistence of the Kidney Disease bacterium *Renibacterium salmoninarum*, in coho salmón *O. kisutch* (Walbaum), eggs treated during and after water hardening with povidone-iodine . J. Fish. Dis. 9 : 461-464 .

Evelyn, T. 1988. IN: AquaNor 87, Trondheim International Conference, Norske, Norway .

Fariás, C., A. Adams, R. Richard. 1994. Antigenic analysis of *Renibacterium salmoninarum* using monoclonal and polyclonal antibodies against extracellular and cell surface antigens. International Symposium on Aquatic Animal Health . Seattle, U.S.A.

Fariás, C. 1995. Immunopatological studies on *Renibacterium salmoninarum* the causative agent of Bacterial Kidney Disease (BKD) . Tesis presentada para el grado de Ph. D. en Acuicultura Veterinaria de la Universidad de Stirling, Stirling, Escocia.

Fiedler, F., R. Draxl. 1986. Biochemical and immunological properties of the cell surface of *Renibacterium salmoninarum*. J. Bacteriol. 168: 799-804.

Getchell, R., J. Rohovec, J. Fryer. 1985. Comparison of *Renibacterium salmoninarum* isolates by antigenic analysis. Fish Pathol. 20: 149-159.

Godin, J. 1983. Monoclonal antibodies: principles and practice. Academic Press, London.

Griffiths, G., W. Lynch. 1991a. Instability of the major soluble-antigen produced by *Renibacterium salmoninarum*. J. Fish Dis. 1: 55-56.

Griffiths, G., G. Oliviers, J. Fildes, W. Lynch. 1991b. Comparison of Western-blot, Direct fluorescent-antibody and Drop-plate culture methods for the detection of *Renibacterium salmoninarum* in Atlantic salmon (*Salmo salar*). Aquaculture 3:117-119.

Griffiths, G., K. Liska, W. Lynch. 1996. Comparison of a kidney tissue and ovarian fluid from broodstock Atlantic salmon for detection of *Renibacterium salmoninarum* use of SKDM broth culture with Western blotting to increase detection in ovarian fluid. Dis. Aquat. Org. 1:3-9.

Henríquez, C. 1996. Estudio de la prevalencia de *Piscirickettsia salmonis* y *Renibacterium salmoninarum* en reproductores salmonídeos y su transmisión vertical. Tesis, M. V., Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias, Valdivia, Chile.

Hsu, H., P. Bowser, J. Schachte. 1991. Development and evaluation of a monoclonal antibody based enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of *Renibacterium salmoninarum* infection. J. Aquat. Animal Health 3: 168-175.

Inglis, V., R. Roberts, N. Bromage. 1993. Bacterial diseases of fish. pp.177-195 .

Kimura, T., M. Yoshimizu. 1981. A coagglutination test with antibody sensitized staphylococci for rapid and simple diagnosis of Bacterial Kidney Disease (BKD). Develop. Biol. Stand. 49:219-224.

Klempau, A., C. Smith. 1993. Ictioinmunología general e inmunoprofilaxis aplicada en salmonídeos. Puerto Montt, Chile, pp. 54-64.

Kusser, W., F. Fiedler. 1983. Murein type and polysaccharide composition of cells walls from *Renibacterium salmoninarum*. FEMS Microbiol. Lett. 20 : 391-394 .

Melendez, R. 1993. Evolución de anticuerpos detectados mediante ELISA, en terneras vacunadas en forma tradicional con *Brucella abortus*, Cepa 19 . Tesis para optar al Título Profesional de Médico Veterinario de la Escuela de Ciencias Veterinarias y pecuarias. Universidad de Chile, Santiago, Chile.

Méndez, R., C. Munita. 1989. La salmonicultura en Chile. 1° Ed., Fundación Chile.

Méndez., R. 1996. En la temporada 1995: Cultivos sobrepasan los 500 millones de dolares. Agua Noticias Int. 28: 7-17.

Meyers, T., S. Short, C. Farrington, K. Lipson, H. Geiger, R Gates. 1993. Comparison of the enzyme-linked immunosorbent-assay (ELISA) and the fluorescent antibody test (FAT) for measuring the prevalences and levels of *Renibacterium salmoninarum* in wild and hatchery stocks of salmonid fishes in Alaska, USA . Dis. Aquat. Org. 3: 131-138.

Milstein, C., G. Koler. 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature 256: 495-497.

Munro, A., D. Bruno. 1988. Vaccination against Bacterial Kidney Disease. Fish vaccination. pp. 124-134.

O'Flynn, F., G. Friars, S. Griffiths, K. Mellville. 1996. Studies on Bacterial Kidney Disease resistance.

Pascho, R, D. Mulcahy. 1987. Enzyme linked immunosorbent assay for soluble antigen of *Renibacterium salmoninarum*, the causative agent of salmonids Bacterial Kidney Disease . Can. J. Fish. Aquat. Sci. 44: 183-191.

Remington, R., A. Schork. 1970. Statistics with applications to the biological and health sciences. pp. 229-252.

Roberts, R 1981. Fish Patology. Bailliere Tindall, London.

Rockey, D., L. Gilkey, G. Wiens, S. Kaatari. 1991. Monoclonal antibody based analysis of the *Renibacterium salmoninarum* p57 protein in spawning chinook and coho salmon . J, Aquat. Animal Health 3: 23-30.

Sakai, M., N. Amaaki, S. Atsuta, M. Kobayashi. 1987. Comparativo sensitivities of several Dot Blot methods used to detect Bacterial Kidney Disease . J. Fish. Dis. 10: 229-231.

Sakai, M., M. Solimán, T. Yoshida, M. Kobayashi. 1993. Identification of a pathogenic fish bacteria using the API ZYM system. Can. J. Fish. and Aquat. Sci. 6: 1137-1141.

Sanders, J., J. Fryer. 1980. *Renibacterium salmoninarum* the causative agent of Bacterial Kidney Disease in salmonid fishes . Int. Jour. of Sys. Bacter. 30 : 23-30 .

Silva del Pozo, C. 1990. Diagnóstico y prevalencia de la Enfermedad Bacteriana del Riñón (BKD) en salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) de cultivo en la X Región de Chile. Tesis M. V., Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias, Valdivia, Chile.

Solar, L, T. Evelyn. 1991. Una patología incidiosa, la Enfermedad Bacteriana del Riñón. Medidas para evitar su propagación en Chile. Agua Noticias Int. 9: 53-57.

Stoskopf, M. 1993. Fish Medicine. Edit. W. B. Saunders Company, Philadelphia. pp.368-370.

Suzumoto, B., C. Schreck, J. Mc Intyre. 1977. Relative resistences of three transferrin genotypes of coho salmón (*Oncorhynchus kisutch*) and their hematological responses to Bacterial Kidney Disease . J. Fish. Res. Board. Can. 34: 18.

Turaga, P., G. Wiens, S. Kaatari. 1987. Analysis of *Renibacterium salmoninarum* antigen production in situ. Fish. Pathol. 22: 209-214.

White, M., C. Wu, S. Albrechts. 1995. Comparison of diagnostic-test for Bacterial Kidney Disease in juvenile steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*) . J. of Vet. Diag. Inv. 4: 494-499.

Wiens, G., S. Kaatari. 1991. Monoclonal antibody characterization of a leukoagglutinin produced by *Renibacterium salmoninarum*. Infection and Immunity. 59: 631-637.

Wood, P., P. Wiens, J. Rohove, D. Rockey. 1995. Identification of an immunologically cross reactive 60 kDa *Renibacterium salmoninarum* protein which is distinct from p57, implications for immunodiagnostic . J. Agua. Dis. pp. 1-15.

Yoshimizu, M., R. Ji, T. Nomura, T. Kimura. 1987. A false positive reaction in the indirect fluorescent antibody test for *Renibacterium salmoninarum* ATCC 33209 caused by *Pseudomonas sp.* Rep. Hokkaido Salmón Hatchery. 41: 121-127.

ANEXO N° 1**Medios de cultivo bacteriano:****Agar KDM-2**

Peptona	5 g
Estracto de levadura	0,25 g
L-Cisteína hidrociorada	0,5 g
Agar-agar	7,5 g

Disolver en 450 ml de agua desionizada.

Ajustar el pH = 6,5.

Esterilizar a 121° C por 15 minutos.

Agregar 50 ml de suero fetal bovino, previamente inactivado y filtrado.

Traspararlo a placas.

Para el caldo se realiza el mismo procedimiento, pero no se incluye como ingrediente el agar-agar.

Agar TSA

Peptona tripticasa	7,5 g
Peptona phytona	2,5 g
NaCl (opcional)	2,5 g
Agar-agar	7,5 g

Disolver en 500 ml de agua destilada.

Ajustar el pH = 7,3.

Esterilizar a 115° C por 10 minutos.

Traspararlo a placa.

ANEXO N° 2

Medios de cultivo para hibridomas:

Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM)

DMEM	500 ml
Suero fetal bovino	50 ml
Piruvato de sodio	5 ml
Glutamina	5 ml
Penicilina-estreptomicina	2,5 ml

El suero fetal bovino es mejor agregarlo en el momento en que se va a utilizar el medio.

Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI)

RPMI	
Suero fetal bovino	10%
Piruvato de sodio	1×10^{-3} molar
2- Mercapto-etanol	5×10^{-5} molar
Penicilina	100-125 UI/ml
Estreptomicina	$7,5 \times 10^{-5}$ molar
Anfoterecina B	2-5 ug/ml

El suero fetal bovino es mejor agregarlo en el momento en que se va a utilizar el medio.

ANEXO N° 3

Tinción de Gram

Fijar la preparación a la llama.
Teñir con cristal violeta por 2 minutos.
Lavar con agua.
Cubrir con lugol por un minuto.
Lavar con agua.
Decolorar con alcohol por 30 segundos.
Lavar con agua.
Cubrir con safranina por 15 segundos.
Lavar con agua.
Secar y mirar con aceite de inmersión.

Prueba de oxidasa

A partir de la colonia sospechosa se coloca algo de material sobre una tira de reacción "oxidasa" (Merck N° 13300), la cual se homogeniza uniformemente sobre su superficie. La reacción se debe leer al cabo de un minuto. En caso de reacción positiva se produce un color negro azulado en la zona de reacción.

Prueba de catalasa

Para determinar la catalasa se coloca una gota de una solución al 10 % de agua oxigenada sobre un portaobjeto. La colonia sospechosa se homogeniza en esta solución. En caso de reacción positiva se produce un rápido desprendimiento de burbujas de gas.

Determinación enzimática usando API ZYM

La galería debe inocularse con 100 µl por pocillo de una suspensión bacteriana fresca, la cual está a una DO_{610} 1,0 (aproximadamente 1×10^9 bacterias por ml), luego se incuba en una cámara húmeda a 22° C por 28 hrs. Una gota del reactivo ZYM A se añade a cada pocilio y a continuación se coloca una gota del reactivo ZYM B a cada pocilio. Hay que permitir que desarrolle coloración por 5 minutos, luego la galería se ubica bajo una fuente de luz poderosa por unos 10 segundos para eliminar el color amarillento que a veces se forma de background. Los resultados son leídos desde la galería usando una tabla provista por los fabricantes Bio Mériux (La Balmeles Grotte, 38390, Monteliu, Francia).

La lectura es mediante valores del 0 al 5, el 0 corresponde a una reacción negativa, el 5 corresponde a una reacción de intensidad máxima, las reacciones intermedias van del 1-4, según intensidad, ayudándose con la tabla de lectura. El número aproximado de nanomoles formados por la actividad enzimática puede deducirse de la intensidad de las reacciones obtenidas.

ANEXO N° 4

Congelamiento de hibridomas

Traspasar el contenido de la botella de cultivo a un tubo para centrífuga.

Centrifugar por 5 minutos a 1500 rpm y luego retirar el sobrenadante.

Reconstituir el pellet que se formó en el paso anterior en 1,5 ml de un medio especialmente elaborado para congelar los hibridomas, hecho en base a un 50% de suero fetal bovino, 40% de DMEM y 10% de dimetil sulfoxido (DMSO).

Llevar la suspensión rápidamente a congelación, a una temperatura de -70°C , por 24 horas.

Traspasar el vial a nitrógeno líquido (-196°C).

Descongelamiento de hibridomas

Extraer el vial del estanque de nitrógeno líquido y sumergirlo parcialmente en agua a 37°C , hasta que se descongele.

Depositar el contenido del vial en un tubo para centrífuga que contenga 1 ml de suero fetal bovino y 5 ml de DMEM.

Centrifugar por 5 minutos a 1500 rpm y luego verificar si se formó un pellet.

Eliminar el sobrenadante y repetir los dos últimos pasos.

Homogenizar el pellet con medio DMEM, más un 10% de suero fetal bovino y traspasarlo a una botella de cultivo.

Llevar la botella de cultivo a una Estufa de CO_2 e incubar a 37°C .

ANEXO N°5

Reactivos para el ensayo inmuno-enzimático (ELISA):

Solución PBS (pH 7,2)

NaCl	8,00 g
K ₂ HPO ₄	1,21 g
KH ₂ PO ₄	0,34 g
Agua destilada	1000 ml

Buffer carbonato-bicarbonato (cobertura)

Na ₂ CO ₃	1,59 g
NaHCO ₃	2,93 g
Agua destilada	1000 ml

Ajustar a pH = 9,6 y utilizarlo en fresco.

Buffer de extracción

Corresponde a la misma composición de la solución PBS, más un 0,05% de Tween-20.

Lavado de baja concentración salina (10x)

Trisma base	24,2 g
NaCl	222,2 g
Thimerosal	1 g
Tween-20	5 ml
Agua desionizada	1000 ml

Ajustar a pH = 7,4 y almacenar a 4° C.

Lavado de alta concentración salina (10x)

Trisma base	24,2 g
NaCl	292 g
Thimerosal	1 g
Tween-20	10 ml
Agua desionizada	1000 ml

Ajustar a pH = 7,4 y almacenar a 4° C.

Buffer substrato (10 x)

Acido cítrico 21 g

Acetato de sodio (anhidro) 8,2 g

Agua desionizada 100 ml

Ajustar el pH = 5,4. Se le deben añadir 3,3 μ l de H₂O₂ (30 %) por cada 10 ml de buffer substrato en el momento de ser utilizado.

Cromógeno

Acido acético glacial 2 ml

Tetrametil-benzidina 0,07896 g

Agua desionizada 4 ml

Almacenar en un frasco opaco o cubierto a 4° C.

Solución stop

Acido sulfúrico 11,11 ml

Agua desionizada 89,99 ml

Mezclar cuidadosamente y en forma lenta.

ANEXO N° 6**Representación de una placa de ELISA/UACH**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	B			CS			C+			M1		
B	M2			M3			M4			M5		
C	M6			M7			M8			M9		
D	M10			M11			M12			M13		
E	M14			M15			M16			M17		
F	M18			M19			M20			M21		
G	M22			M23			M24			M25		
H	M26			M27			M28			M29		

DONDE:

B Buffer de extracción.

CS Control sano.

C+ Control positivo.

M1 a M29 Muestras de tejido renal.

Representación de una placa de ELISA comercial

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	B		CA		CM		CB		M1		M2	
B	M3		M4		M5		M6		M7		M8	
C	M9		M10		M11		M12		M13		M14	
D	M15		M16		M17		M18		M19		M20	
E	M21		M22		M23		M24		M25		M26	
F	M27		M28		M29		M30		M31		M32	
G	M33		M34		M35		M36		M37		M38	
H	M39		M40		M41		M42		M43		M44	

DONDE:

B Buffer de extracción.

CA Control alto, cuya concentración es de 24 ng/ml.

CM Control medio, cuya concentración es de 12 ng/ml

CB Control bajo, cuya concentración es de 6 ng/ml.

M1 a M44 Muestras de tejido renal.

ANEXO N° 7

Absorvancias promedio a 450 nm, obtenidas al testear como muestras suspensiones bacterianas en el ELISA/UACH, para determinar reacción cruzada con *Renibacterium salmoninarum*.

Bacteria	Absorvancia
<i>Renibacterium salmoninarum</i>	1,517
<i>Aeromonas salmonicida</i>	0,010
<i>Carnobacterium piscicola</i>	0,009
<i>Corynebacterium sp.</i>	0,002
<i>Micrococcus luteus</i>	0,017
<i>Pseudomonas sp.</i>	0,004
<i>Yersinia ruckeri</i>	0,004

ANEXO N° 8

Absorvancias promedio a 450 nm, obtenidas al chequear 50 muestras de tejido renal de salmónidos al comparar el ELISA/UACH con un ELISA comercial.

N° Muestra	ELISA comercial	ELISA UACH	N° Muestra	ELISA comercial	ELISA UACH
1	0,072	0,009	26	0,020	0,025
2	0,077	0,009	27	0,017	0,001
3	0,252	0,403	28	0,020	0,022
4	0,068	0,044	29	0,013	0,034
5	0,067	0,016	30	0,017	0,012
6	0,168	0,263	31	0,082	0,046
7	0,090	0,031	32	0,143	0,034
8	0,069	0,049	33	0,258	0,111
9	0,164	0,317	34	0,301	0,119
10	0,069	0,019	35	0,075	0,038
11	0,210	0,226	36	0,082	0,176
12	0,062	0,081	37	0,506	0,454
13	0,064	0,110	38	0,384	0,151
14	0,048	0,045	39	0,535	0,390
15	0,105	0,057	40	0,107	0,093
16	0,483	0,333	41	0,565	0,490
17	0,428	0,068	42	0,314	0,282
18	0,050	0,490	43	0,124	0,111
19	0,357	0,056	44	0,221	0,102
20	0,389	0,091	45	0,107	0,086
21	0,404	0,114	46	0,449	0,173
22	0,110	0,052	47	0,446	0,169
23	0,524	0,026	48	0,379	0,148
24	0,163	0,038	49	0,079	0,061
25	0,185	0,044	50	0,148	0,107

ANEXO N° 9

Absorvancias promedio a 450 nm, obtenidas al testear 50 muestras de tejido renal de salmónidos, para comparar el anticuerpo monoclonal 11D11 con uno comercial, al utilizarlos como marcadores en un ELISA.

N° Muestra	Anticuerpo comercial	Anticuerpo 11D11	N° Muestra	Anticuerpo comercial	Anticuerpo 11D11
1	0,294	0,241	26	0,035	0,054
2	0,197	0,151	27	0,081	0,090
3	0,061	0,035	28	0,125	0,133
4	0,166	0,116	29	0,110	0,083
5	0,130	0,100	30	0,029	0,028
6	0,137	0,130	31	0,203	0,206
7	0,048	0,022	32	0,034	0,051
8	0,054	0,016	33	0,052	0,060
9	0,365	0,252	34	0,067	0,086
10	0,140	0,075	35	0,054	0,064
11	0,174	0,135	36	0,058	0,055
12	0,072	0,039	37	0,077	0,066
13	0,050	0,098	38	0,073	0,051
14	0,054	0,097	39	0,221	0,148
15	0,050	0,098	40	0,119	0,122
16	0,054	0,097	41	0,050	0,059
17	0,049	0,045	42	0,077	0,111
18	0,038	0,089	43	0,074	0,077
19	0,038	0,051	44	0,061	0,056
20	0,033	0,052	45	0,085	0,083
21	0,194	0,427	46	0,300	0,287
22	0,098	0,340	47	0,068	0,061
23	0,512	0,487	48	0,049	0,064
24	0,026	0,041	49	0,052	0,040
25	0,034	0,058	50	0,080	0,067

AGRADECIMIENTOS

Al finalizar el presente trabajo de investigación mis sinceros agradecimientos a las siguientes personas:

Al Dr. Carlos Farías R., profesor patrocinante, por su valiosa colaboración, orientación y amistad entregada en la realización de esta tesis.

Al Dr. Hugo Folch V., profesor copatrocinante, por su siempre buena disposición y sus prácticos consejos.

Al Dr. Ricardo Enriquez S., por su buena disponibilidad, pragmatismo y amistad.

A la T. M. Sra. Mónica Morirás S., por su paciencia y constante ayuda en los trabajos realizados en el laboratorio.

También debo agradecer a quienes cooperaron de alguna forma en la ejecución de esta tesis:

Dra. Ximena Rojas S.

Dr. Santiago Ernst M.

T. M. Sra. Gisela Eller S.

Sra. Mónica González.

Sr. Esteban Henriquez.