

Variabilidad del virus de la septicemia hemorrágica viral de la trucha en España.

Resumen: Cinco aislados españoles del virus de la SHV o Septicemia Hemorrágica Viral de la trucha se han estudiado comparativamente. El aislado 144 identificado en España en 1984, serotipo F₁, se ha purificado y caracterizado. Se ha utilizado este virus para producir ascites conteniendo anticuerpos policlonales en ratón. Por inmunoprecipitación con estos anticuerpos, no se ha detectado variabilidad proteica entre cinco aislados españoles y tres cepas de referencia del virus de la septicemia hemorrágica viral. Se ha detectado heterogeneidad en la región de la proteína N (38 KDa) en todos los aislados y cepas de referencia. La utilización de anticuerpos monoclonales anti-SHV pone de manifiesto algunas variaciones antigénicas por ELISA. La infección experimental de truchas con este virus en acuarios controlados produce un 50% de mortalidad a los 7 días después de la infección, pudiendo reaislarse virus infectivo de las truchas muertas.

Palabras clave: Septicemia hemorrágica viral. Variabilidad, purificación. Infección experimental.

*Basurco, B. y Coll, J.M.
Departamento de Sanidad Animal.
Centro de Investigación y Tecnología
del INIA. Embajadores, 68. 28012 Ma-
drid.*

INTRODUCCION

La producción actual de truchas en Europa alcanza unas 112.000 Tm. Los principales países productores son: Francia (25%), Dinamarca (20%), Italia (19%), España (13%) y Alemania (12%). En España la producción ha seguido un incremento constante desde 1964 hasta la producción actual, que se sitúa entre 15.000-20.000 Tm/año. Ello supone 50 a 70 millones de truchas y una importación de 200-400 millones de huevos (10, 17).

Estas producciones están amenazadas durante el engorde, principalmente, por la Septicemia Hemorrágica Viral (SHV). Así, entre el 30 al 60% de

la producción anual de salmónidos se pierde por infecciones de SHV en dos países vecinos de España: Francia e Italia. La SHV produce una mortalidad cercana al 100% en piscifactorías afectadas (17). En España se han diagnosticado desde 1980, un total de 22 infecciones que afectaron a más de 5.000 Tm de producción (Cachafeiro, comunicación personal). En el INIA se han aislado e identificado 7 brotes en los últimos 4 años (9).

El virus de la SHV es similar al virus de la rabia de mamíferos y al de la Necrosis Hematopoiética Infecciosa (NHI) de los salmónidos, existente en Norteamérica. Aunque muy similares los virus del SHV y de la NHI no tienen

reacciones cruzadas por seroneutralización. El virus se transmite horizontalmente a través del agua por los peces infectados y los portadores (16), y verticalmente a través de la superficie de huevos infectados. El virus de la SHV se caracteriza por su morfología en forma de bala, su membrana lipídica y sus proyecciones de glicoproteínas (11). Su genoma es de unas 11.000 bases de RNA de polaridad negativa, codificando 4 proteínas virales: la polimerasa L (190 KDa), la glicoproteína G (65 KDa), las proteínas de la matriz M₂ y M₁ (25 y 20 KDa, respectivamente) y la nucleocapsida N fosforilada (40 KDa). Estas proteínas se han mapeado en el genoma del virus de la NHI en el orden 5'-L-G-M₂-M₁-N 3',

además se ha descrito una proteína no viral (12 KDa) que mapea entre L y G (17). El virus de la SHV tiene 3 variantes antigénicas definidas por seroneutralización descritas como F₁, F₂ y 23.75 (9, 10).

Actualmente no hay una vacuna para controlar los brotes de SHV. Además los métodos de detección actuales del virus se basan en procedimientos trabajosos o no suficientemente sensibles (9). El estudio de la variabilidad del virus de la SHV de la trucha en España es necesario, tanto para comenzar a evaluar las posibilidades de prevención, como para mejorar los métodos de diagnóstico. En este trabajo se reportan los primeros resultados de esta investigación.

MATERIALES Y METODOS

Aislamiento de virus SHV

Los aislados de SHV en España se obtuvieron a partir de cultivos de células epiteliales de carpa (EPC) durante los años 1984 a 1986 (10). Estos aislados fueron identificados por seroneutralización utilizando suero de conejo anti-SHV. Los antisueros fueron el anti F₁ (cedido por el Dr. V. Jorgensen) y el polivalente anti F₁, F₂ y 23.75 (cedido por el Dr. Kinkelin), según se ha descrito con anterioridad (9). Se han estudiado 3 aislados en trucha arco iris (el 689, aislado en Galicia en 1984; el 471, aislado en Navarra en 1986 y el 144, aislado en Salamanca en 1984), uno en barbo (el 789, aislado en Aragón en 1986) y uno en salmón (el 472, aislado en Cantabria en 1986).

Producción y purificación

El aislado 144 se purificó por triple clonaje en células EPC según Kinkelin (12) y se amplificó por 3 pases a baja multiplicidad de infección. La purificación se llevó a cabo según el procedimiento descrito por Kinkelin (12).

Se utilizó medio MEM modificado por Mac Pearson y Stocker BHK 21 o RPMI-1640 (Flow, Ayrshire, Scotland), 10% suero fetal de ternera con 100 µg/ml estreptomicina, 100 UI/ml penicilina y 60 UI/ml micostatina o con 25 µg/ml gentamicina 1 µg/ml fungizona, 10 mM Hepes, 28°C en 5% de CO₂ en aire. Después de la infección con

0,001 virus por célula, el medio se pasó a 2% suero fetal de ternera y las células se dejaron a 14°C sin CO₂ hasta la destrucción total del tapiz (unos 4-6 días). El sobrenadante se homogeneizó pasándolo por un Potter, por congelación-descongelación o por sonicación (3 pulsos de 15'' a 40 W). El precipitado a 3.000 g 30 min se eliminó y el sobrenadante se puso a 7% polietilenglicol 6.000 y 2,3% ClNa, manteniéndose con agitación a 4°C durante al menos una noche. Después se centrifugó a 10.000 g 45 min. El precipitado se disolvió en tampón TNE (0,15 M Tris, 0,15 M ClNa, 1 mM EDTA, pH 7,6) a 1/30 del volumen inicial. La solución opalescente resultante se centrifugó a 80.000 g 270 min sobre un gradiente de 15-45% de sacarosa en TNE (Beckman L5-75 rotor SW27). La banda conteniendo el virus se concentró a 80.000 g 270 min en TNE (9, 12).

Titulación del virus de la SHV

La titulación del virus se hizo en placas de 96 pocillos tapizadas con EPC en 100 µl de medio con 10% suero fetal de ternera y guardadas a 14°C en atmósfera de 5% CO₂ en aire hasta el momento de la infección, con un 80% de confluencia, aproximadamente. Después de quitar el medio se añadieron 20 µl de diluciones del virus seriadas de 5 en 5 o decimales en medio completo al 2% de suero fetal de ternera, se incubó durante 1 hora a 14°C, se añadieron 100 µl de medio al 2% y se incubó durante 5-7 días a 14°C hasta observar efecto citopático. El título se definió como la mitad del inverso de la última dilución que dio efecto citopático: DICT/50/ml (9).

Las proteínas víricas se valoraron por A280 nm, considerando una absorción ϵ de 1,4 o por el método de Bradford, según Coll (2).

Análisis de las proteínas víricas por inmunoprecipitación

Se llevó a cabo por electroforesis en geles de poliacrilamida del 15% (2). Para el análisis de las proteínas de los distintos aislados, se hicieron infecciones a un virus por célula en tapices de EPC en placas Nunc (Kamstrup, Denmark) de 96 pocillos, como se describió arriba. A las 24 h después de la infección se añadió metionina ³⁵S

(Amersham, París, Francia) a una concentración final de 200 µCi/ml. Una vez que la infección destruyó totalmente el tapiz, el sobrenadante bien se inmunoprecipitó con antisuero anti-SHV polivalente (mezcla de F₁, F₂ y 23.75) donado por el Dr. Kinkelin siguiendo el método de Alcaraz et al. (1), o bien se inmunoprecipitó con ascites anti-SHV-144. El sobrenadante se congeló y descongeló. A 10 µl de sobrenadante se le añadieron 10 µl de 1% NP40 en PBS, (NaCl 0,15 M, Na₂PO₄, pH 7,6), 0,1% mertiolato y se agitó 15 min a temperatura ambiente. Después se añadieron 20 µl de ascites anti-SHV, se dejó a 4°C toda la noche y se adicionaron 40 µl de antisuero anti-inmunoglobulinas de ratón (Nordic, Tilburg, The Netherlands) diluidos 1/3 en PBS, 0,1% mertiolato. Después de 1 hora de incubación con agitación a temperatura ambiente, los precipitados a 10.000 g 5 min se lavaron 3 veces con PBS, 0,1% mertiolato. Por último 20 µl del precipitado se disolvieron en tampón de muestras de electroforesis. La preparación de las muestras, secado del gel, exposición sobre Hyperfilm TM-MP (Amersham, París, Francia), revelado y otros detalles se hicieron según se describe en Alcaraz et al. (1) y Coll (2). Como marcadores coloreados se utilizaron los marcadores azules de BRL (Bethesda, MD, USA) y los arco iris de Amersham (París, Francia). Una vez teñidos con Coomassie (Coll, 1978) o con nitrato de plata (Biorad, Richmond, California, USA) los geles se densitometraron con un Beckman model CDS-200 a una longitud de onda de 600 nm.

Obtención de ascites anti-SHV en ratón.

El virus SHV-144 purificado y concentrado se inyectó a ratones BALB-C. Las inyecciones fueron intraperitoneales de 200 µl por ratón (25 µg de proteína vírica) cada mes durante 4 meses. La primera inyección se hizo con adyuvante completo de Freund's, las restantes con el adyuvante incompleto (8). A los 4 meses, células del mieloma X63/Ag 8653 se inyectaron a ratones (1 × 10⁶ células por ratón) y después de 10 días se extrajeron líquidos ascíticos mediante inyecciones de suero salino (3). El ascites se obtuvo según se describe en Coll (3). El ascites se precipitó a 50% saturación de sulfato amónico, se disolvió en PBS

0,1 % mertiolato, se dializó extensivamente y se guardó a 4°C. Se comprobó la actividad anti-virus de SHV mediante ELISA de competición utilizando placas pegadas con virus SHV. Tanto el virus SHV purificado como el antisero anti-virus SHV-F₁ de referencia competían con la reacción ascites-virus SHV pegado mientras que el extracto celular de EPC no infectada no competía (datos no mostrados). Unos 500 µg de virus SHV precipitado por polietilenglicol se separaron por electroforesis en gel de poliácridamida en condiciones desnaturizantes y después se transfirieron a nitrocelulosa y se revelaron con anti-SHV siguiendo los métodos descritos para inmunoblotting por Lorenzen et al. y Martínez y Coll (13, 14).

Antigenicidad frente a anticuerpos monoclonales

Se llevó a cabo por inmunoensayo en fase sólida (ELISA), según los métodos descritos por Martínez y Coll (14, 15).

Se utilizaron inmunoglobulinas de conejo anti-inmunoglobulinas totales de ratón marcadas con peroxidasa (Nordic, Tilburg, The Netherlands) y protegidas por adición de hemo (4). La fase sólida utilizada fueron placas de poliestireno de 96 pocillos Dynatech (Plochigen, West Germany) recubiertas con 0,2 µg de proteína vírica por pocillo. El tempón sustrato utilizado se describe en Coll (7). Los anticuerpos monoclonales utilizados como sobrenadantes de cultivo de hibridomas anti N y anti M₂, fueron cedidos por el Dr. Vestergard Jorgensen (13).

Infecciones experimentales

Diecisiete truchas entre 5 y 10 g libres de virus según análisis de laboratorio (9) se mantuvieron en acuarios de 10 l con agua decolorada con tiosulfato, tratada con un filtro de carbón activo, aireada y con temperatura controlada entre 8-9°C. La infección se hizo con una dosis de virus de 10⁵ DICT₅₀/ml durante 2 h en 1 l de agua a 8°C. La mortalidad se registró diariamente. De los peces muertos y congelados se pudo aislar SHV en el riñón siguiendo la metodología convencional (9, 10).

TABLA I
Purificación del virus de la SHV

Fracción	Volumen ml	DICT ₅₀ × 10 ⁻⁷	
		/ml	Total %
Sobrenadante	250	0,3	100
Precipitado PEG	3	18,0	73
Filtrado G-25	20	1,8	48
Ultracentrifuga	8	2,7	28

El resultado se valoró por DICT₅₀ según materiales y métodos. Se ha presentado la media de dos titulaciones independientes.

RESULTADOS

Aislamiento y purificación de los virus de brotes de SHV en España

Los aislados que se estudian en este trabajo, así como la metodología utilizada para su diagnóstico se han des-

crito recientemente (9, 10). De los 7 aislados obtenidos, 5 se han podido clonar y cultivar en células EPC. Tres se han aislado de trucha arco iris, uno de barbo y uno de salmón. El aislado de trucha arco iris número 144 se seleccionó para su posterior estudio, debido a su alta virulencia en campo comparado con los otros aislados.

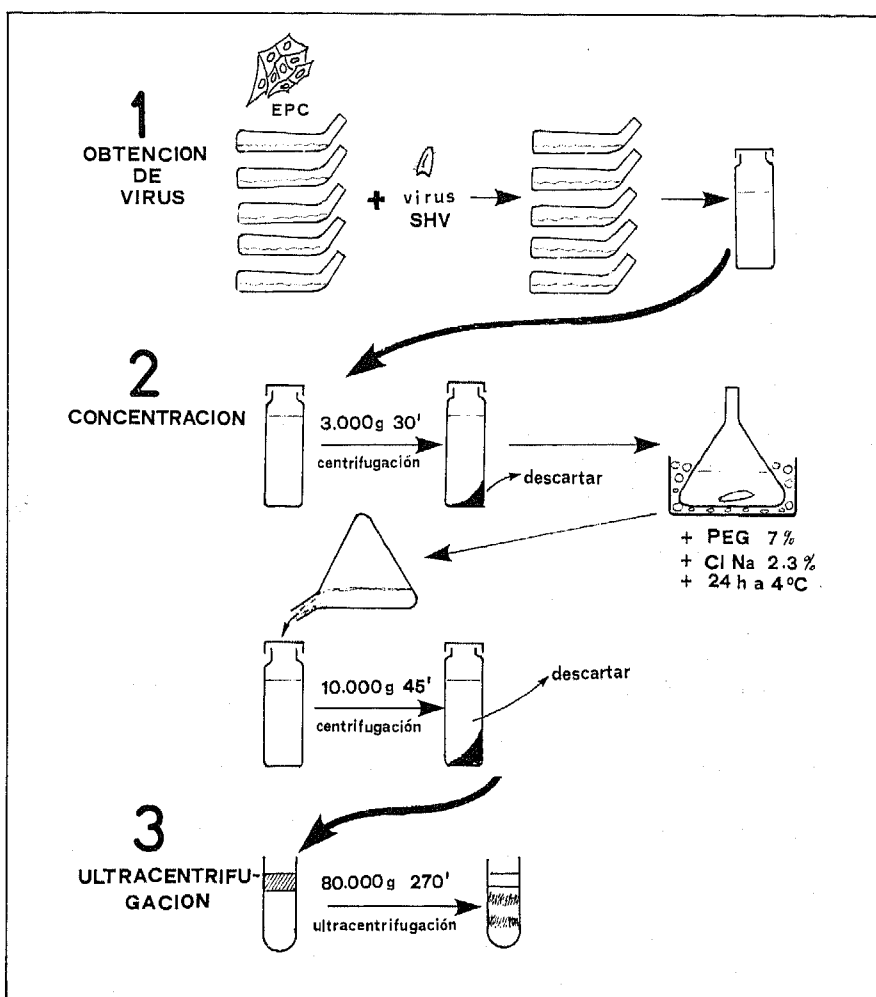


Fig. 1. Esquema de purificación de SHV. Tiene 3 pasos: 1) obtención del virus en cantidad, 2) concentración con PEG después de eliminar restos celulares, y 3) purificación por ultracentrifugación.

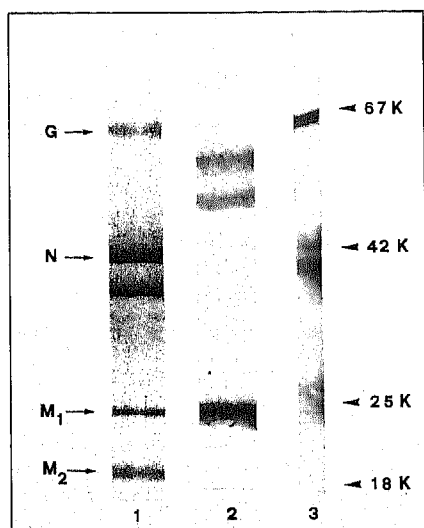


Fig. 2. Caracterización de los reactivos utilizados por electroforesis en geles de poliácridamida. Los reactivos se obtuvieron según se describe en materiales y métodos. 1, virus SHV-144 purificado; 2, ascites policlonal anti-SHC-144 obtenido en ratón y purificado por precipitación en sulfato amónico; 3, proteínas víricas reconocidas por el ascites policlonal anti-SHV-144 por inmunoblotting. G, N, M₁ y M₂, nomenclatura de las proteínas víricas. Los números a la derecha son los pesos moleculares en KDa de los marcadores.

En algunos de los primeros ensayos se comprobó que el rendimiento de virus obtenido era bajo ($0,15 \times 10^7$ DICT₅₀/ml) respecto a 10^7 - 10^8 reportado por otros autores (12). Por lo tanto se estudió la producción del virus SHV en células EPC en varios medios de cultivo y en diferentes condiciones de gaseo. Con el medio RPMI 1640 se produjeron de 60 a 150 veces más virus que con el medio DMEM, tanto en presencia como en ausencia de CO₂. En presencia de CO₂ aunque el efecto citopático tarda casi el doble de tiempo en aparecer (9 días comparado con 4-5 días) se produce de 12 a 30 veces más virus que sin CO₂. Resultados similares se han observado en tres experimentos distintos.

La Tabla I muestra los resultados de una purificación típica de virus SHV, según el esquema representado en al Fig. 1. La Fig. 2 muestra los perfiles de proteínas obtenidos con el virus purificado.

Una vez observado un efecto citopático completo, el cultivo puede dejarse 2 días más a 14°C sin disminución del título. La congelación-descongelación de los cultivos ha dado resultados variables aumentando el título

unas 10 veces o disminuyéndolo unas 50 veces, según los experimentos. La concentración con polietilenglicol aumenta la actividad específica 60 veces, disminuye el volumen y se recupera el 73% de la infectividad. Además, el perfil de proteínas del concentrado de PEG por electroforesis es muy similar al de después de la ultracentrifugación (datos no mostrados).

El precipitado de PEG puede purificarse más por ultracentrifugación (Tabla I). Pero en este caso se pierde entre el 76 al 88% de la infectividad. Antes de la ultracentrifugación se experimentó la cromatografía en gel G-25 para eliminar el PEG. Este paso no es aconsejable ya que aumenta las pérdidas al 60%, y el volumen unas 6-7 veces (Tabla I). Tanto el rendimiento como la pureza se afectan por la duración de la ultracentrifugación. El óptimo en ambos casos se encuentra a los 270 minutos (datos no presentados).

La eliminación completa del suero del medio de cultivo durante la infección (del 2% al 0%) aunque disminuye el rendimiento de virus no afecta el proceso infeccioso (datos no presentados).

La Fig. 2 muestra la composición del ascites anti-virus 144 con un 50% de IgG, y el resto IgM y albúmina. Este ascites reconoce la proteína G, N y M del virus de la SHV por inmunoblotting (Fig. 2).

Variabilidad proteica y antigénica

Las características de las proteínas de los aislados de SHV españoles se

estudiaron por electroforesis en geles de poliácridamida en condiciones desnaturalizantes y posterior autorradiografía de las proteínas sintetizadas utilizando metionina S³⁵ e inmunoprecipitadas con antisuero anti-SHV (F₁, F₂ y 23.75) de referencia y con ascites anti-SHV 144.

La Fig. 3 muestra las bandas de proteínas víricas inmunoprecipitadas por el ascites anti-SHV 144. Resultados similares se obtuvieron con el antisuero polivalente anti-SHV.

Ambos anti-SHV inmunoprecipitan las proteínas N, M₁ y M₂ de todos los aislados españoles y los virus-SHV de referencia, en contraste con el NHI (al que sólo precipitan una proteína en la región N) y las células no infectadas. Aparece también una proteína de bajo peso molecular (<18 KDa) en todos los inmunoprecipitados.

En todos los aislados, excepto el NHI, aparece heterogeneidad en la región N (33-38 KDa). Todos los aislados y el F₁ tienen una mayor proporción de la proteína de 38 KDa que de la de 33 KDa en contraste con F₂ y 23.75. En el aislado 471 y el F₂ se detecta una banda intermedia entre las 2 proteínas de la región N.

Las intensidades de las bandas entre los aislados variaban de experimento a experimento posiblemente por la dificultad de sincronización de las infecciones. Por ejemplo, la aparente debilidad del aislado 798 en la Fig. 3 no era reproducible en otros experimentos.

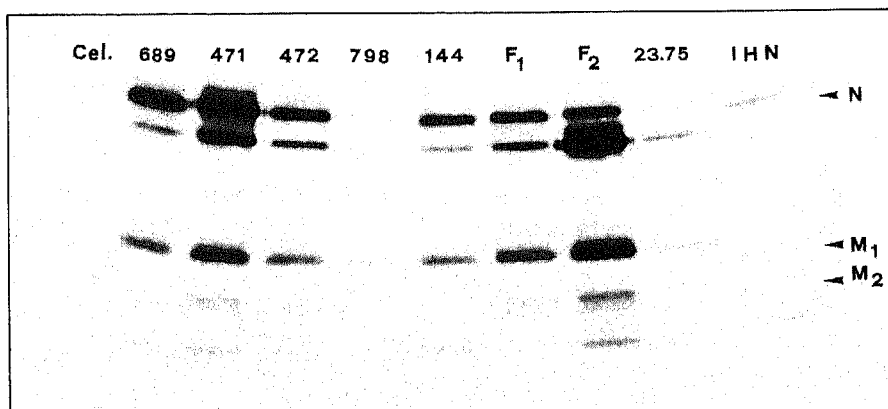


Fig. 3. Inmunoprecipitación con ascites policlonal de ratón anti-SHV-144. Autorradiografía de la electroforesis en gel de los inmunoprecipitados de los distintos aislados virales con el ascites policlonal de ratón anti-SHV-144, después de un efecto citopático completo. N, M₁ y M₂ son las proteínas víricas inmunoprecipitadas. La última banda coincide con el frente del gel.

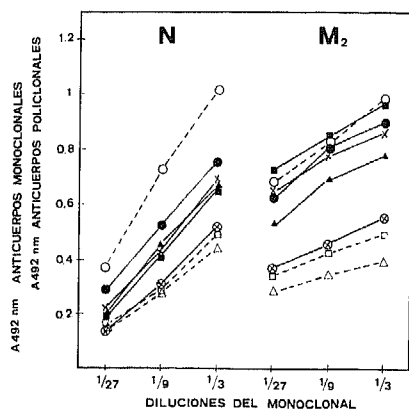


Fig. 4. Reconocimiento de los aislados de SHV pegados en fase sólida por anticuerpos monoclonales anti proteínas virales N y M₂ (ELISA). Los anticuerpos monoclonales utilizados fueron obtenidos contra la cepa F₁ y cedidos por el Dr. V. Jorgensen como sobrenadantes de cultivo de los hibridomas correspondientes. Los anticuerpos policlonales utilizados de referencia se obtuvieron contra el aislado 144 en ratón. Se utilizaron unos 0,2 µg de proteína viral pegados en cada pocillo. Cantidad de proteína viral estimada por electroforesis de cada aislado. Otros detalles según materiales y métodos. ●, 471; ▲, 472; ■, 689; X, 789; □, 144, o, SHV referencia F₁; △, SHV referencia F₂; □, SHV referencia 23.75.

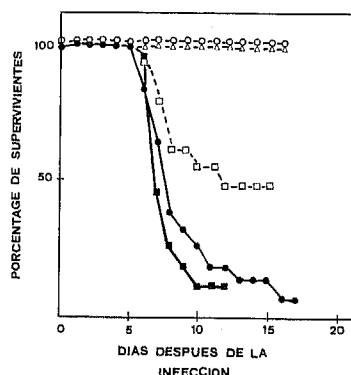


Fig. 5. Infecciones experimentales con el aislado 144 de SHV. Diecisiete truchas entre 5 y 10 g se mantuvieron en acuarios de 10 l con agua de clorada, aireada y a 8°C de temperatura. La infección se hizo durante 2 h en 1 l de agua a 8°C. La mortalidad se registró diariamente. o—o, peces no infectados; —, peces infectados con 10⁵ DICT₅₀/ml de virus SHV tratados previamente con Triton X100 al 1% durante 30 min; □—□, peces infectados con 10⁵ DICT⁵⁰/ml de virus VHS tratados previamente con extracto de riñón de trucha; ●—●, peces infectados con 10⁵ DICT₅₀/ml; —, peces infectados con 10⁵ DICT₅₀/ml y transportados a 15°C en el día 6.

Los 5 aislados del virus de la SHV se identificaron por seroneutralización utilizando antisueros de referencia internacionales anti F₁, F₂ y 23.75. Los

5 aislados podían seroneutralizarse con el antisuero F₁.

La posible variabilidad antigénica se estudió utilizando 2 anticuerpos monoclonales anti proteínas virales específicos para N y M₂.

Una vez concentrados por PEG, los distintos aislados de virus de SHV, se utilizaron para tapizar placas de ELISA a una misma concentración estandarizada tanto mediante estimación de las proteínas virales por electroforesis, como por reacción con ascites de ratón anti-SHV. La Fig. 4 muestra el reconocimiento de los distintos aislados por diluciones de los sobrenadantes de los hibridomas productores de anticuerpos monoclonales antiproteína N y antiproteína M₂ del serotipo neutralizante F₁. Tanto los anticuerpos anti-N como los anti-M₂, reconocen unas 2 veces más intensamente el serotipo de referencia F₁ que los F₂ y 23.75. Los aislados 471, 472, 689 y 798 se comportaron muy similarmente entre sí y en una posición cercana (proteína N) o similar (proteína M₂) al serotipo de referencia F₁. El aislado 144, por este método, es más similar a los serotipos de referencia F₂ y 23.75.

Infecciones experimentales

Para comprobar la virulencia del aislado 144, se realizaron varias infecciones experimentales con este virus. La Fig. 5 muestra la virulencia de este aislado que aún después de varios pases en EPC es capaz de matar a la mitad de la población 6-7 días después de la infección. La experiencia demuestra además la sensibilidad total del virus al 1% Tritonx 100, así como la sensibilidad parcial al tratamiento con extractos de riñón de trucha. El aumento de la temperatura a 15°C después del día 6 no parece alterar el curso de la mortalidad. El virus se volvió a aislar en cultivos celulares de EPC a partir de homogeneizados de riñón de trucha moribunda a los 9 días después de la infección con un título de 8 × 10⁶ DICT₅₀/g de tejido.

DISCUSION

Los estudios de variabilidad proteica no han demostrado una variación importante entre los 5 aislados españoles estudiados y los 3 aislados de re-

ferencia, lo que es favorable al desarrollo de posibles métodos de prevención contra esta enfermedad vírica.

Por otra parte, se ha encontrado una heterogeneidad no descrita en la región N (38 KDa). Al menos se han encontrado 3 bandas, 38, 35 y 33 KDa sin que ello implique necesariamente relaciones estructurales entre ellas. Ninguna de estas 3 proteínas parecen ser contaminantes puesto que son proteínas cuya síntesis se induce por la infección (incorporación de Met S³⁵), se inmunoprecipitan con antiscites anti-SHV 144 y con antisuero anti-SHV polivalente, y, al menos una se detecta por Coomassie en virus purificados (Fig. 2). En el virus NHI procesado simultáneamente no aparece esta heterogeneidad. No obstante alguna de estas proteínas pudiera ser celular ya que una proteína de parecido peso molecular (40 KDa) se observa en extractos de células no infectadas (separable con el uso de gradientes) y aparece débilmente en concentrados purificados a partir de células no infectadas. Lorenzen et al. (13) encuentran una proteína de 33 KDa que reacciona por inmunoblotting con anticuerpos monoclonales anti-N y sólo Kinkelin et al. (11) la detectan en virus purificado. La existencia de heterogeneidad en las bandas N también pudiera explicarse por una variabilidad en la fosforilación de esta proteína. Son necesarios más datos para decidir si estas proteínas están relacionadas entre sí, si son variables o celulares.

El pase por cultivo y las manipulaciones efectuadas *in vitro* al virus no alteran su capacidad infectiva (Fig. 5), por lo que las estructuras encontradas no parecen ser artefactos debidos a la adaptación del virus a las células EPC utilizadas para su cultivo.

Los estudios de variabilidad antigénica, aunque muy limitados por los pocos anticuerpos monoclonales anti-SHV de que se dispone, muestran variaciones en principio correlacionadas con el aislante más virulento en campo, sobre todo en cuanto se refiere a la proteína N. A este respecto aunque la proteína G parece ser la inductora de anticuerpos neutralizantes (13, 22), la proteína N de rabdovirus se ha descrito recientemente como la que ayuda a la respuesta y a la memoria inmunológica (22). Todo ello resalta la im-

portancia de estos estudios. Actualmente se están obteniendo anticuerpos monoclonales anti-SHV con el fin de completar este estudio en nuestro laboratorio.

Las metodologías puestas a punto y los resultados obtenidos hacen que estemos preparados a identificar nuevas variantes de SHV que puedan apa-

recer en un futuro, de cara a nuestra incorporación a la CEE con el consiguiente aumento de intercambio de peces vivos. Por otra parte estas metodologías pueden aplicarse al desarrollo y estudio de nuevos métodos de diagnóstico, de prevención y/o terapéutica de esta enfermedad de los salmonidos. En concreto, la amplificación de secuencias virales con la Taq poli-

merasa (19) y la utilización de sondas de DNA (5) permitirían un aumento de sensibilidad y una rapidez de diagnóstico capaces de detectar portadores. Por otra parte, los anticuerpos monoclonales anti-inmunoglobulinas de truchas se utilizarán también como métodos complementarios para la detección de portadores (20, 21).

Summary: Five spanish isolates of the virus of the VHS or Viral Haemorrhagic Septicaemia have been studied comparatively. The 144 isolate identified in Spain in 1984, serotype F₁, has been purified and characterized. We have used this virus for production of polyclonal antibodies ascites from mice. By immunoprecipitation we have not detected any protein variation among 5 spanish isolates and 3 reference strains of the virus of the viral haemorrhagic septicaemia. We have detected heterogeneity in the region of the protein N (38 KDa) in all the isolates and reference strains. The use of monoclonal antibodies anti-VHS shows some immunogenic differences among the studied isolates by ELISA. The experimental infection of trouts in controlled aquaria produced 50% mortality 7 days after infection. Infective virus could be isolated from the death trouts.

Key words: Viral haemorrhagic septicaemia. Variability, purification. Experimental infection.

BIBLIOGRAFIA

- Alcaraz, C., Laviada, M.D. y Escribano, J.M. Análisis mediante electroforesis bidimensional de las proteínas inducidas por el virus de la Peste Porcina Africana y sus propiedades antigénicas. *Med. Vet.* 5: 353-358, 1988.
- Coll, J.M. Factors stimulating chick erythroid cell proliferation and differentiation in vitro. PhD Thesis. Massachusetts Institute of Technology. Cambridge, Mass. USA, 1978, 165 págs.
- Coll, J.M. Injection of physiological saline facilitates recovery of ascitic fluids for monoclonal antibody production. *J. Immunol. Methods.* 104: 219-222, 1987.
- Coll, J.M. Heme increases peroxidase-antibody activity in aged conjugates. *J. Immunol. Methods.* 104: 259-263, 1987.
- Coll, J.M. Diagnóstico en bacteriología animal con anticuerpos monoclonales y sondas de DNA. *Med. Vet.* 5: 263-274, 1988.
- Coll, J.M. Obtención de inmunidad mediante vacunas constituidas por subcomponentes antigénicos de microorganismos. *Immunología* 7: 38-48, 1988.
- Coll, J.M. Addition of reducing agents to the peroxidase-o-phenylenediamine buffer reduces background of enzyme-immunoassays. *Rev. Esp. Fisiol.* 45: 41-46, 1989.
- Iturralde, M. y Coll, J.M. High stability hybrids producing monoclonal antibodies against human C-reactive protein. *Rev. Esp. Fisiol.* 40: 279-288, 1984.
- Jiménez de la Fuente, J., Sanjuán Hernández, M.L., Marcotegui Jaso, M.A., García Crespo, T. y Basurco de Lara, B. Diagnóstico de las enfermedades víricas de los peces en España. *Med. Vet.* 5: 595-600, 1988.
- Jiménez de la Fuente, J., Marcotegui, M.A., Sanjuán, M.L. and Basurco, B. Diagnosis of viral disease in salmonid farms in Spain. *Bull. Europ. Associat. Fish. Pathol.* 271: 3-4, 1988.
- Kinkelin, P., Bearzotti-Le Berre, M. and Bernard, J. Viral haemorrhagic septicaemia of rainbow trout: Selection of a thermoresistant virus variant and comparison of polypeptide synthesis with the wild-type virus strain. *J. Virol.* 36: 652-658, 1980.
- Kinkelin, P. Le Virus d'Egtved. II Purification. *Ann. Rech. Veter.* 3: 199-208, 1972.
- Lorenzen, N., Olesen, N.J., Jorgensen, P.E.V. Production and characterization of monoclonal antibodies to four Egtved virus structural proteins. *Dis. Aquat. Organism.* 4: 35-42, 1988.
- Martínez, J. and Coll, J.M. Preliminary clinical studies of C-reactive protein quantified by enzyme-linked immunoassay. *Clin. Chem.* 33: 2185-2190, 1987.
- Martínez, J. and Coll, J.M. Selection and clinical performance of monoclonal anti C-reactive protein in ELISA quantitative assay. *Clin. Chim. Acta.* 176: 123-132, 1988.
- Neukirch, M. Demonstration of persistent viral haemorrhagic septicaemia (VHS) virus in rainbow trout after experimental waterborne infection. *J. Vet. Med. B.* 33: 471-476, 1986.
- Ortega Rodríguez, C., Basurco de Lara, B., Muzquiz Moracho, J.L., Jiménez de la Fuente, J.L. Septicemia Hemorrágica Viral de la Trucha. *Med. Vet.* (aceptado).
- Paloma, C., Martín, S.H. y Coll, J.M. Obtención de anticuerpos monoclonales y posible uso en diagnóstico clínico. *Immunología* 6: 322-347, 1982.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. and Erlich, H.A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* 239: 487-491, 1988.
- Sánchez, C. y Coll, J.M. La estructura de las inmunoglobulinas de los peces. *Immunología* (en prensa).
- Sánchez, C., Domínguez, J. and Coll, J.M. Immunoglobulin heterogeneity in the trout *Salmo gairdneri* (Richardson). *J. Fish Diseases* (en prensa).
- Winton, J.R., Arakawa, C.K., Lannan, C.N. and Fryer, J.L. Neutralizing monoclonal antibodies recognize antigenic variants among isolates of infectious hematopoietic necrosis virus. *Dis. Aquat. Organism.* 4: 199-204, 1988.