

La septicemia hemorrágica viral de la trucha: modelo para estudios de vacunación por subunidades

Basurco, B., Sanz, F., Estepa, A., Barrera, J. y Coll, J.M.

Departamento de Sanidad Animal, INIA, Embajadores 68, 28012 Madrid

Uno de los principales problemas de las vacunas por subunidades es su baja inmunogenicidad. Uno de los principales objetivos de la investigación actual es, por lo tanto, cómo estimular la respuesta inmunitaria a un nivel suficiente para asegurar la protección contra la infección. Los experimentos en este campo han cambiado poco desde Pasteur, son las pruebas de protección in vivo que utilizan la resistencia a la infección de animales de experimentación previamente inoculados con la supuesta vacuna. La vacuna adecuada para el antígeno/animal concreto es un problema de prueba/error que hay que optimizar en cada caso con costosas pruebas in vivo. El modelo de la septicemia hemorrágica viral de la trucha (Fig. 1), tiene la doble ventaja de utilizar rabdovirus (el modelo de rabia es en el que más se ha avanzado en la vacunación) y truchas (animales poco evolucionados y cuya inmunología puede ser más sencilla de entender). Además los cultivos de linfocitos nos permiten la realización de pruebas de "protección in vitro" con la consiguiente economía de trabajo y tiempo, de cara al desarrollo de una posible vacuna por subunidades.

Importancia de la septicemia hemorrágica viral (SHV)

Estos estudios se centran en el rabdovirus SHV, el agente patógeno más temido en la trucha, la especie piscícola de mayor producción en España (20.000 Tm/año). Esta producción supone de 50 a 70 millones de truchas adultas y una importación de 200-400 millones de huevos. La producción anual de truchas en Europa alcanza las 112.070 Tm, siendo los principales países productores: Francia (25%), Dinamarca (20%), Italia (19%), España (13%) y Alemania (12%). Más del 30% de la producción anual se pierde por infecciones de SHV en dos países vecinos: Francia e Italia. En España se han diagnosticado desde 1980, un total de 22 casos que produjeron 5.000 Tm de pérdidas. Se ha demostrado también mediante infecciones experimentales que la lubina y el rodaballo son

sensibles a este agente, y se han aislado rabdovirus en salmón, anguila y lenguado. El modelo SHV-trucha, podrá aplicarse a otras especies cuyo cultivo en España comenzará a

ser importante y además tendrá repercusiones internacionales en el marco de la CEE.

Esta enfermedad produce en una semana una mortalidad alta (Fig. 2),

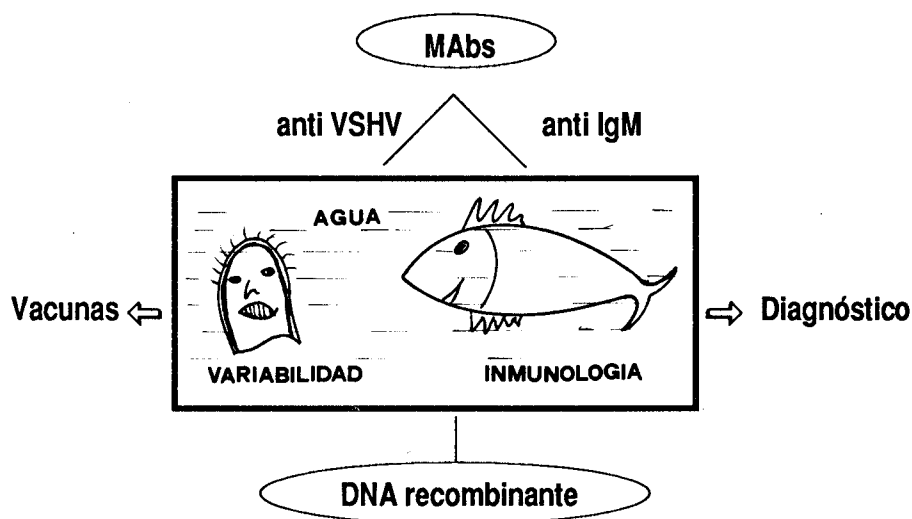


Fig. 1 Esquema estratégico

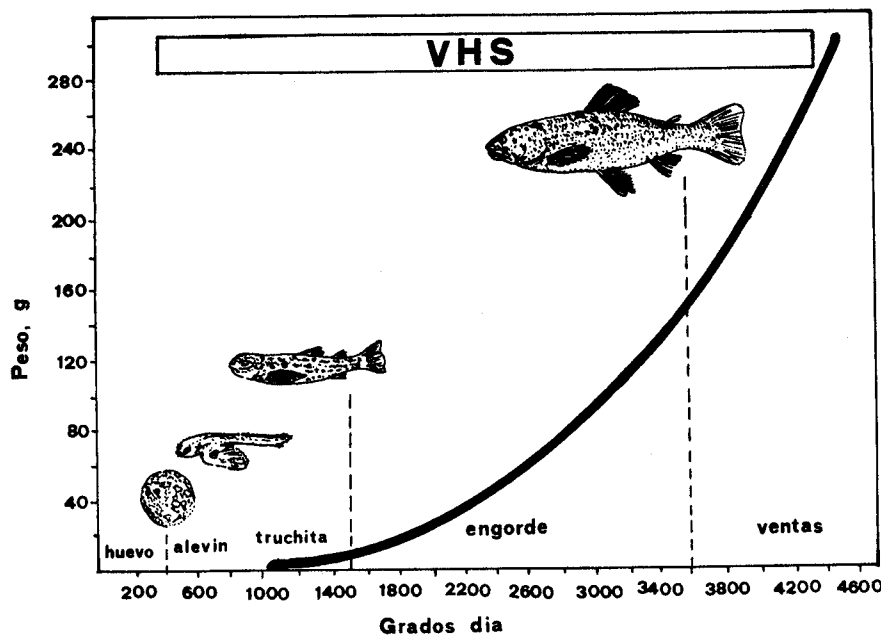


Fig. 2 Crecimiento de la trucha arco iris y períodos de mortalidad causados por el virus VHS

lo que implica una alta incidencia económica, ya que puede dar al traste con toda la producción en cualquier momento. El único remedio actual es el sacrificio de todos los animales y la desinfección de la piscifactoría, puesto que no existen vacunas. Por otra parte y paralelamente a los métodos de diagnóstico que se han desarrollado para la enfermedad, habrían de desarrollarse métodos más sensibles y rápidos para la detección de portadores, que son los responsables del contagio.

Situación de la investigación actual

El virus de la septicemia hemorrágica viral (SHV), es un rhabdovirus endémico en Europa. En España, El INIA ha aislado e identificado 7 brotes de este virus (Fig. 3). 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 de Norteamérica. Aunque muy similares, los virus de la SHV y de la NHI no tienen reacciones cruzadas por seroneutralización.

El virus se transmite por los peces

infectados, por los portadores, y a través de la superficie de los huevos. El virus de la SHV se caracteriza por su morfología en forma de bala, su membrana lipídica y sus proyecciones de glicoproteínas; posee 3 serotipos y sus células diana parecen ser los linfocitos. Su genoma es de unas 11.000 bases de RNA de polaridad negativa que codifica 5 proteínas virales: la polimerasa L (200 KDa), la glicoproteína G (65 KDa), las proteínas de la matriz M_1 y M_2 (24 y 20 KDa, respectivamente), y la fosfoproteína de la nucleocapsida (40 KDa). Estas proteínas se han mapeado en el genoma del virus de la NHI en el orden: 5'-L-G- M_2 - M_1 -N3' y además se ha descrito una proteína (12 KDa) no presente en los viriones, que mapea entre L y G.

En el virus de la rabia se ha demostrado la participación de la fosfoproteína N además de la glicoproteína G en la protección contra la infección. En el virus de la NHI, la glicoproteína G parece ser la única capaz de inducir una respuesta de anticuerpos neutralizantes *in vitro*. Tanto el virus de la SHV inactivado, como las glicoproteínas purificadas de NHI o de SHV son capaces de inducir una respuesta en salmónidos que les pro-

tege de una exposición a dosis letales del virus. Los anticuerpos monoclonales neutralizantes contra NHI o de SHV reconocen epítomos localizados en la glicoproteína y protegen de la infección por inmunización pasiva. En el caso de la SHV se han encontrado pocos anticuerpos monoclonales neutralizantes. El virus de la SHV atenuado por pases en cultivo a alta temperatura pierde virulencia y puede proteger a las truchas contra la infección. Por otra parte, en el virus de la NHI se ha clonado y secuenciado la proteína G. Recientemente se ha demostrado a escala de laboratorio, que la inmunización de truchas con un lisado de *E. coli* expresando una región no glicosilada compuesta por 104 aminoácidos de la proteína G, es capaz de proteger contra la infección de NHI. Se piensa que el lipopolisacárido de *E. coli* actúa de adyuvante.

Variabilidad proteica, antigénica y de virulencia

Trabajamos con 5 aislados de SHV españoles (aislados en trucha, salmón y barbo), 3 serotipos neutralizantes-internacionales (F_1 , F_2 y 23.75) y una cepa de NHI. La variabilidad se ha estudiado por movilidad electroforética, síntesis de proteínas utilizando marcaje radioactivo, inmunoprecipitación con antiseros obtenidos después de inmunizar conejos con virus purificado, 30 anticuerpos monoclonales obtenidos contra las 5 proteínas mayoritarias del virus, isoelectroenfoque e infecciones experimentales *in vitro* e *in vivo*. Hemos encontrado poca variabilidad, tanto a nivel de proteínas, como de antigenicidad y virulencia (infecciones experimentales en acuario). Estos resultados dan esperanzas a la posibilidad de obtención de una vacuna que proteja contra cualquier cepa del virus. Hemos descubierto una nueva proteína mayoritaria N de menor peso molecular (34 KDa) probablemente originada a partir de N (reconocida por los mismos monoclonales) y que se localiza exclusivamente

en los virus defectivos. Actualmente, está en estudio el origen y el posible significado de esta nueva proteína.

Mejora de los métodos de diagnóstico actuales

Se está desarrollando un ELISA *sandwich* basado en dos anticuerpos monoclonales anti-N (la proteína mayoritaria y menos variable). La obtención de 20 anticuerpos monoclonales anti-SHV de alta afinidad seleccionados por ELISA ha sido posible gracias a la utilización de virus altamente purificado, protocolos de 9 meses de inmunización en ratones y ELISA con pegado a sequedad. Estos anticuerpos se han obtenido en ascites, serotipado, identificado por *immunoblotting* y comprobado por inmunofluorescencia. Por otra parte se han seleccionado 12 hibridomas por seroneutralización. Actualmente se ha comprobado en un caso tanto una respuesta neutralizante, como un *immunoblotting* antiglicoproteína del anticuerpo monoclonal producido en ascites, así como la respuesta aparentemente neutralizante de otros hibridomas todavía no clonados.

Mejora de diagnóstico por sondas de DNA

La detección del virus de la SHV está por debajo de los límites de las técnicas de aislamiento celular, tanto en animales portadores, como en poblaciones con bajo porcentaje de infección. Para detectar secuencias virales de SHV en estos casos, se necesitan tanto una amplificación de las secuencias específicas, como un método no isotópico de detección de sondas. Ambos métodos se están desarrollando para hacer el ensayo susceptible de uso con un número de muestras elevado. Las sondas para DNA se están haciendo a partir del genoma de SHV con transcriptasa reversa primada con fragmentos *random* de DNA.

Para aumentar la sensibilidad del método de detección se utilizará la amplificación de las secuencias del virus con la *Taq* polimerasa después de primar específicamente con secuencias complementarias virales obtenidas de los plásmidos recombinantes. Para detectar las secuencias específicas amplificadas se están construyendo plásmidos PUC re-

combinantes conteniendo uno o varios genes. Estos plásmidos se están usando para hacer sondas biotiniladas por varios métodos. Por otra parte, se trabaja en un procesamiento sencillo de las muestras y una hibridación en placas de 96 pocillos fácilmente escalable (*hibrelisa*).

Respuesta inmunológica humoral

Un caso especial en cuanto a ruta de inoculación de vacunas ocurre en la trucha. La imposibilidad de una inoculación animal por animal a efectos prácticos ha hecho desarrollar métodos de inoculación en masa mediante la exposición a la vacuna en el medio acuático y penetración de esta en la trucha a través de las branquias.

En el empleo de vacunas por subunidades, la baja respuesta inmunitaria local puede ser la causa de que los individuos inmunizados tengan poca resistencia contra la infección natural, aunque esa misma vacuna pueda inducir respuesta inmunitaria sistémica. Para una adecuada protección local hay que estudiar por lo tanto, no solamente el suero y sus IgM, sino también, los quidos de mucosas (branquias) y los anticuerpos presentes en ellos. Por lo tanto, el problema de estas vacunas por subunidades no replicativas, se concreta en la formulación de aditivos y/o rutas de inoculación que permitan la protección contra una reinoculación local y, para mayor seguridad, contra una posterior extensión sistémica.

Para el estudio de la respuesta humoral, por una parte se ha purificado la inmunoglobulina de trucha y se han obtenido 20 anticuerpos monoclonales contra esta molécula, y por otra, uno de los anticuerpos monoclonales anti-IgM de trucha seleccionada por su alta afinidad y su reconocimiento del 85% de las IgM, se está utilizando como reactivo para el estudio de la respuesta humoral anti-SHV en la trucha.

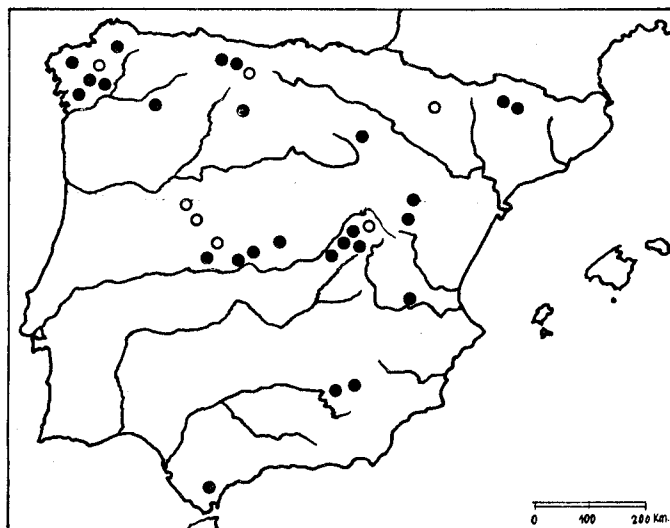


Fig. 3 Distribución geográfica de los principales brotes de NPI (•) y SHV (o) españoles aislados en el INIA. (NPI: necrosis pancreática infecciosa de la trucha)

Respuesta inmunológica celular *in vitro* a las proteínas virales

El efecto de protección a la infección que se busca con una vacuna no siempre se correlaciona con un nivel adecuado de anticuerpos inducidos, bien porque no es condición necesaria, o porque no solo intervenga la inmunidad humoral sino también la celular. La contribución relativa entre ellas es desconocida, así como la identidad de sus epitopos respectivos.

Se ha demostrado la proliferación de 5 tipos morfológicos descritos por primera vez en células procedentes del riñón de trucha (su principal órgano hematopoiético) desarrollando una técnica de clonaje en fibrina. Cada tipo singular de célula es dependiente de mitógenos o de anticuerpos monoclonales contra IgM de trucha. La experimentación en marcha se orienta al estudio de la respuesta inmunológica de las células procedentes de truchas inmunizadas con virus de la SHV o resistentes a la infección. Por un lado, se están purificando las proteínas virales para probarlas *in vitro* una a una y en todas las posibles combinaciones y por otro lado, se están clonando los genes correspondientes en *E. coli* para producir estas proteínas tanto para un primer *test in vitro*, como para la subsiguiente comprobación de la vacunación *in vivo*. Mediante esta estrategia se experimentarán cientos de combinaciones (proteínas aisladas, proteínas y péptidos expresados en *E. coli* y adyuvantes) antes de seleccionar unas decenas para las pruebas de protección *in vivo*, mucho más costosas y difíciles de ejecutar.

Utilización de adyuvantes

Las subunidades antigénicas tienen que ser inmunopotenciadas mediante su incorporación a una determinada formulación para su utilización como vacunas. Los efectos de los componentes de una formulación, pueden agruparse en:

- *Subunidades antigénicas* (origen, secuencia, conformación, determinantes, etc.).
- *Transportador*, compuesto de alto peso molecular al que se liga covalentemente la subunidad y que es inmunogénicamente inerte (proteína, péptidos sintéticos).
- *Inmunestimulantes*, aditivos que estimulan la respuesta inmunitaria, que pueden ser inespecíficos (polisacáridos de paredes bacterianas, muramyl-dipéptido, interferón, etc.) o específicos (IgM específica, lípidos ligados covalentemente, etc.).
- *Controladores de difusión*, aditivos que hacen que la subunidad se vaya difundiendo poco a poco desde el sitio de aplicación (aceites minerales, sales de aluminio, lípidos ligados covalentemente, liposomas, etc.).
- *Aditivos*, que actúan como estabilizadores y preservadores (glicerol, antibióticos, etc.).

Se conoce desde hace años que la exposición de las truchas durante unos 30 segundos a yersinias muertas en el agua, deja una memoria inmunológica de un año de duración. Utilizando linfocitos *in vitro*, se están realizando estudios con los lipopolisacáridos de las bacterias acuáticas patógenas para la trucha para seleccionar un posible adyuvante (yersinia, aeromonas y renibacterium). También se están estudiando como pueden afectar las principales variables de calidad/toxicidad del agua a la inmunidad de la trucha.

Agradecimientos

Agradecemos la colaboración de José Jimenez, Mar Babin, Carmen Sanchez y del Dr. Javier Dominguez y la dirección del Departamento al Dr. J. Manuel Sanchez Vizcaino. También agradecemos la asistencia técnica de Parrilla, P., Sevilla, M.T., Frías, M. D., Plasencia, F. y Hernandez, C.

Referencias

- Basurco, B. y Coll, J. M. (1989).

Spanish isolates and reference strains of viral haemorrhagic septicaemia virus show similar protein size patterns. Bull. Eur. Ass. Fish. Pathol. 9: 92-95.

- Basurco, B. y Coll, J.N. (1989). Variabilidad del virus de la septicemia hemorrágica viral de la trucha en España. Med. Vet. 6: 425-430.

- Coll, J.M. (1988). Obtención de inmunidad mediante vacunas constituidas por subcomponentes antigénicos de microorganismos. Immunologika, 7: 38-48.

- Coll, J.M. (1989). Mitogen-induced proliferation of rainbow trout lymphocytes in fibrin-clots. J. Immunol. Methods (enviado).

- Rueda, A. Z. y Coll, J.M. (1988). Cloning of myelomas and hybridomas in fibrin-clots. J. Immunol. 114: 213-217.

- Sanchez, M.C.T. y Coll, J.M. (1989). La estructura de las inmunoglobulinas de peces. Immunologika, 8: 47-54.

- Sanchez, C., Dominguez, J. y Coll, J.M. (1989). Immunoglobulin heterogeneity in the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. J. Fish Diseases (aceptado).

- Sanz, F., Basurco, B., Babin, M., Dominguez, J. y Coll, J.M. (1989). Variability of viral haemorrhagic septicaemia virus as studied with monoclonal antibodies against its five structural proteins. J. Gen. Virol. (enviado).

- Basurco, B., Sanz, F. y Coll, J.M. (1990). Non-infective particles of viral haemorrhagic septicaemia virus contain two related nucleoproteins. J. Virol. (enviado).

- Sobrino, F., Escribano, J.M. y Coll, J.M. (1989). Diagnóstico de virus por amplificación específica y detección no radioactiva. Biotecnología, 5: nº 6, 8-10. ■