

Pruebas de inmunización-protección con los primeros aislados del virus de la septicemia hemorrágica viral de los peces, en España.

Resumen: La septicemia hemorrágica viral (SHV) es una enfermedad que afecta a varias especies importantes en la Acuicultura, tales como la trucha, el salmón, la lubina, el rodaballo y la anguila. En este trabajo se han estudiado comparativamente mediante pruebas de inmunización y protección los primeros aislamientos de la septicemia hemorrágica viral en España. Los aislamientos se han efectuado en distintas localizaciones geográficas en España, distintos años y distintas especies y se han comparado con los serotipos (F₁, F₂ y 23.75) internacionales de referencia. Los resultados indican que es posible proteger animales inmunizados con los distintos aislados atenuados a la contraprueba con virus virulento y que los aislados españoles están más relacionados con el serotipo F₂ que con los otros.

Palabras clave: Septicemia hemorrágica viral. Virus SHV. Inmunización. Challenge. Trucha.

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

INTRODUCCION

La septicemia hemorrágica viral (SHV) es una enfermedad producida por un rhabdovirus (3) que afecta principalmente a piscifactorias de salmónidos, tanto en agua dulce, *Salmo gairdneri*, Richardson (24), como en agua salada, *Salmo gairdneri*, Richardson (5) y *Salmo salar* (1, 2, 14). También afecta a otras especies de importancia en acuicultura (9), tales como *Anguilla anguilla* (7), *Dicentrarchus labrax*, Linnaeus y *Scophthalmus maximus*, (6, 8).

Las producciones de salmónidos en Europa están seriamente amenazadas durante el engorde por esta enfermedad. 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 (3). La SHV produce una mortalidad cercana al 100%. En España (18) se han diagnosticado desde 1980, un total de 22 infecciones que afectaron a más de 5.000 Tm de producción. En el INIA se han aislado, identificado y estudiado 5 brotes en los últimos 4-5 años (1,2).

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 y recientemente detectada en Italia (4). Aunque muy similares los virus del SHV y de la NHI no tienen reacciones cruzadas de suero-neutralización. El virus se transmite horizontalmente a través del agua por los peces infectados y los portadores, y verticalmente a través de la superficie de huevos infectados. El virus de la SHV se caracteriza por su morfolo-

gía en forma de bala, sus tres variantes antigénicas (F₁, F₂ y 23.75), su membrana lipídica y sus proyecciones de glicoproteínas.

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 19 KDa, respectivamente) y la nucleocápsida N fosforilada (40 KDa) (3, 20, 21).

Actualmente no hay una vacuna para controlar los brotes de SHV (3). Además los métodos de detección actuales del virus se basan en procedimientos trabajosos o no suficientemente sensibles. El estudio de la variabilidad *in vivo* del virus de la SHV de la trucha en España es necesario, tanto para comenzar a evaluar las po-

sibilidades de prevención, como para mejorar los métodos de diagnóstico. En este trabajo se describen los primeros resultados *in vivo* de esta investigación.

MATERIAL Y METODOS

Aislamiento de virus SHV

Los aislados de SHV en España se hicieron en cultivos de células de epitelio de carpa (EPC) durante los años 1984 a 1986 (18). La sueroneutralización se hizo con suero de conejo anti-SHV cepa F₁ (cedido por el Dr. Vestergard-Jorgensen), según se ha descrito con anterioridad (1, 2). Se han estudiado 3 aislados en trucha arco iris (472, 689 y 144), uno en barbo y uno en salmón (471) que se describen en la Tabla I.

Titulación del virus de la SHV

La titulación del virus se hizo en placas de 96 pocillos tapizadas con células 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 en medio completo al 2% de suero fetal de ternera, se incubó durante 1 hora a 14°C, se añadieron 100 µl de medio y se incubó por 5-7 días a 14°C al aire hasta observar efecto citopático. El título se definió como la mitad del inverso de la última dilución que dió efecto citopático (dosis infectiva de tejido al 50 % o DITC₅₀).

Preparación de los virus para las infecciones

Para la realización de las primeras infecciones experimentales se utilizó el virus 144 en su 10⁹ pase en la línea celular EPC. El virus se produjo a baja multiplicidad de infección (0.001 DITC₅₀/célula), se guardó a -70°C una vez que el tapíz celular mostró un efecto citopático completo, y se tituló previamente a ser utilizado. El virus 144 pasó por truchas, y a partir de las

TABLA I

Aislados españoles y serotipos de referencia internacionales de los virus SHV utilizados.

Virus	Localización	Año	Especie	Referencia
689	Galicia	1984	Salmo gairdneri, R	Basurco y Coll, 1989 a. (1)
471	Navarra	1986	Salmo gairdneri, R	Basurco y Coll, 1989 a. (1)
144	Salamanca	1984	Salmo gairdneri, R	Basurco y Coll, 1989 a. (1)
472	Cantabria	1986	Salmo salar, L	Basurco y Coll, 1989 a. (1)
798	Aragon	1986	Barbus graellsii, S	Basurco y Coll, 1989 a. (1)
F ₁ *	Dinamarca	<1972	Salmo gairdneri, R	Vestergard-Jorgensen, 1972 (27)
F ₂ *	Dinamarca	<1972	Salmo gairdneri, R	Vestergard-Jorgensen, 1972. (27)
23.75*	Francia	1977	Salmo trutta, L	De Kinkelin and Le Berre, 1977 (11,13)

* Cedido por Dr. P.E. Vestergard-Jorgensen, National Veterinary Lab., Hangovej, Arhus, Denmark.

+ Cedido por Dr. P. De Kinkelin, Centre de Recherches Jony-en-Josas, INRA, Domaine de Vilvert - France.

truchas muertas en un experimento con una mortalidad del 100% se recuperó para ser utilizado en contrapruebas como virus virulento.

Para los estudios comparativos de inmunización se utilizaron los aislados españoles del virus de la SHV en su pase 10⁹ en la línea celular EPC. También se emplearon los tres serotipos del virus de la SHV pasados al menos diez veces en la línea EPC.

Se utilizaron alevines de trucha arco iris (*Salmo gairdneri*, Richardson) con un peso comprendido entre los 0.5 y 10 g según los experimentos. Los alevines se importaron de piscifactorías comerciales del Coto de San Fernando, Sacramenia, Segovia y de Cifuentes, Segovia. Para el transporte de peces se emplearon bolsas de plástico de 1 x 0.38 m llenándolas con la mitad de peces y la otra mitad con oxígeno. También se emplearon bidones de plástico de 30 l de volumen en los que se utilizaron compresores de aire a pilas (Super 9960, Shakespeare).

Las truchas empleadas en las infecciones se consideraron libres de virus después de que pasaron un periodo de al menos dos semanas de aclimatación y de que se examinaran virológicamente 10 peces de cada lote, según se ha descrito anteriormente (18).

Las infecciones se realizaron mediante baño, disminuyendo el volumen de agua de los acuarios a 1 o 2 l y añadiendo virus para lograr una dosis de 10⁵ DITC₅₀/ml durante 2 horas a 10°C (agua enfriada con hielo por fuera de los acuarios) y aumentando la aireación. A continuación se restauró el flujo normal de agua a 1 l/min. En las contrapruebas, 23 días después de la primera infección, cuando ya había cesado la mortalidad, los peces se infectaron mediante baño durante 2 h en 1-2 l de agua con una dosis de 10⁶ DITC₅₀/ml de virus pasado previamente por trucha. Tanto en las infecciones como en las contrapruebas, se llevó un registro diario de la mortalidad y de la temperatura del agua.

Con el fin de confirmar la causa de las mortalidades durante las infecciones experimentales se procesaron las truchas muertas. Los títulos de virus en las truchas se expresaron en dosis infectivas de cultivo de tejido 50 por gramo de tejido (DITC₅₀/g).

Los 10 acuarios de 30 l por acuario, utilizados en las infecciones experimentales estaban hechos de vidrio (Acuarios Nautilus, Madrid). Para reparar uniones y arreglar fisuras en acuarios y cañerías se empleó silicona (Silcat, Catsa) y pegamento de PVC (Tangit, Henkel). Como aireador se

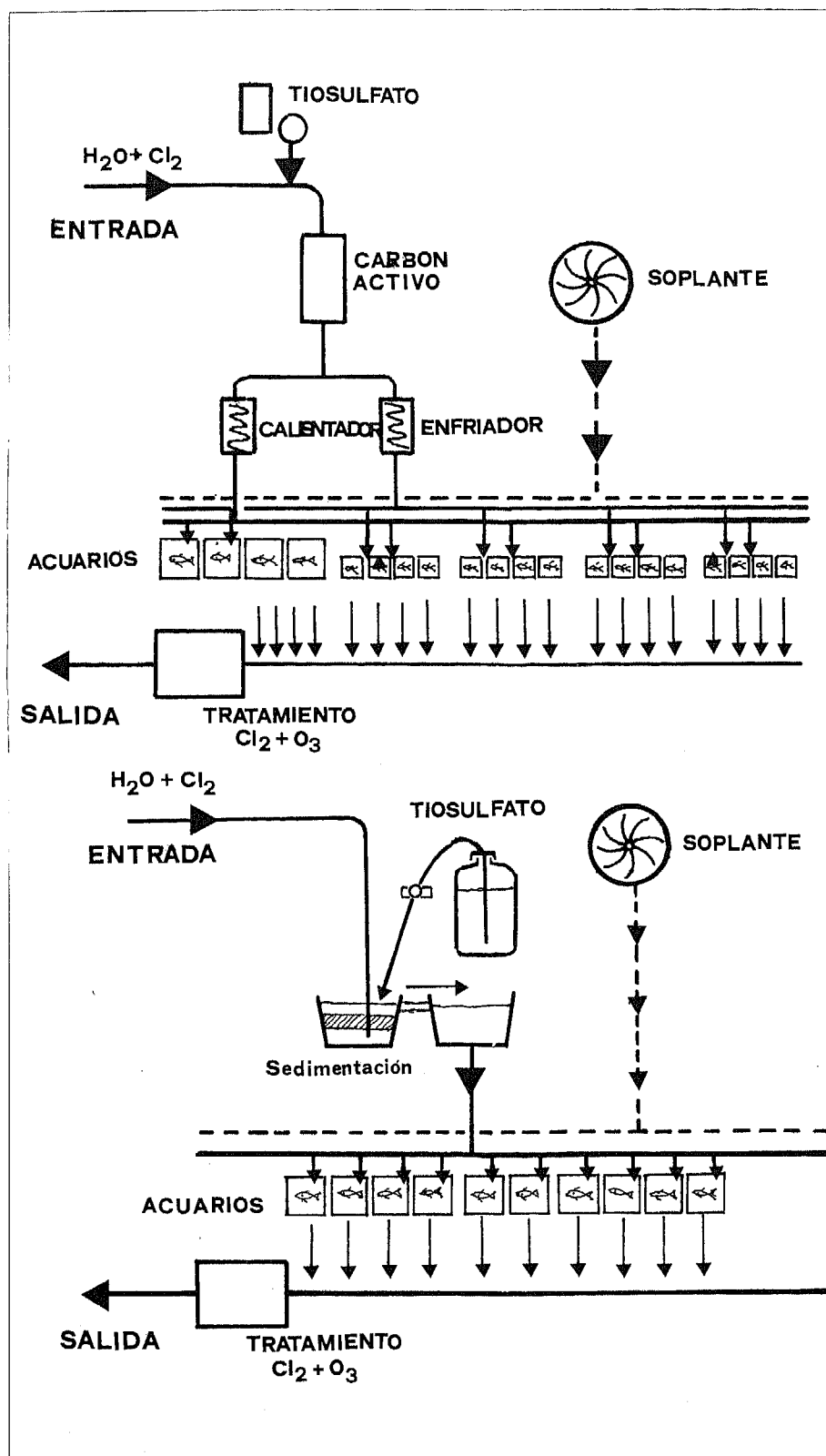


Fig. 1. Esquema de las instalaciones para infecciones experimentales. A: Diseño preliminar. B: Diseño definitivo. En el diseño definitivo se aumentó la renovación del agua a 2 cambios/hora. El volumen de los acuarios fue de 30 l. Se eliminó el filtro de carbón activo, declorándose el agua con un tratamiento de tiosulfato sódico. También se suprimió el enfriador y el calentador y se añadieron dos depósitos a la entrada que permiten hacer nulas las variaciones diarias de presión de agua e independizar la adición de tiosulfato de dichas variaciones.

utilizó un soplane de 0.37 KW (GEBR, Becker) con un flujo de unos 50 m³ de aire a la hora. Para declorar el agua de entrada se utilizó un filtro de carbono activo de 1 x 0.3 m (SETA) y una solución de 25 g/l de sodio tiosulfato (Panreac) con goteo continuo en el agua de entrada (concentración final de tiosulfato de 0.8 mg/l). Para enfriar el agua se utilizó un refrigerante de agua de 150 W de potencia (SOPAL, Himel), y para desinfectar el agua de salida de los acuarios se empleó un ozonizador (Model 100, Sander), así como pastillas de ácido tricloroisocianúrico de 600 g (CTX-380). Regularmente se midió y se registró en un cuaderno la temperatura del agua, así como su pH y su contenido en cloro y nitritos utilizando los test Nitrivier 3 y DPD Total Chlorine de Hach (Loveland, CO). Durante la realización de los experimentos se fueron cambiando y mejorando otros detalles acerca de las instalaciones.

Diseño de instalaciones

Para hacer los estudios de inmunización-protección, se realizaron varios diseños de instalaciones de acuarios en sistema abierto de flujo de agua.

El diseño preliminar y el diseño mejorado aparecen descritos en la Fig. 1 con las variables descritas en las Tablas II y III.

El caudal total de agua se reguló a 10 l/min, que correspondía a 1 l/min por acuario en las instalaciones mejoradas. Uno de los principales problemas fue el de la neutralización del cloro presente en el agua de ciudad (aproximadamente 1 mg/l). En el diseño preliminar se utilizó un filtro de carbón activo, consiguiéndose reducir a cantidades no detectables la presencia de cloro. Además para neutralizar el cloro se añadió tiosulfato sódico (9 gotas/min de una solución madre de 20 g/l). Durante estos ensayos se demostró la eficacia del tiosulfato sódico para neutralizar el cloro (Tabla II), mientras que el filtro de carbono dejaba pasar cantidades de 0.1-0.5 mg/l de cloro que se consideran dosis tóxicas

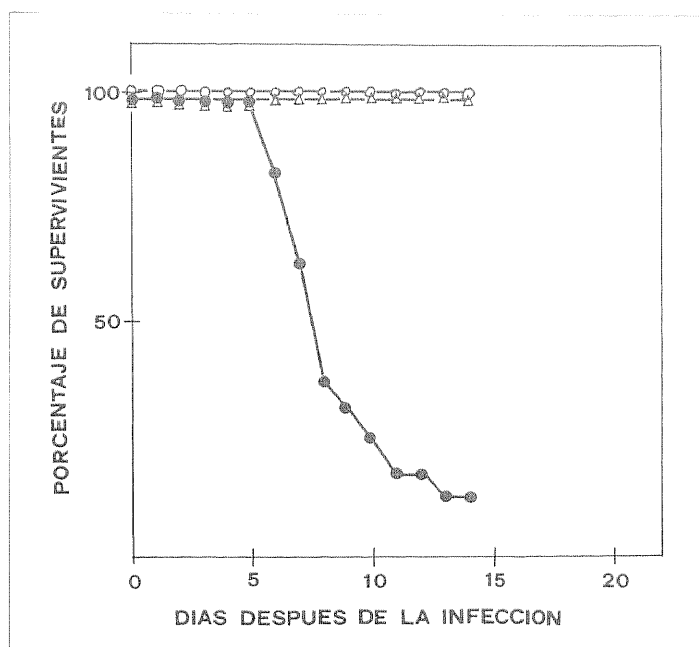


Fig. 2. Resultados de la infección experimental de truchas con el aislado VHS-144

crónicas para alevines de trucha. Con el fin de mantener la temperatura del agua constante a unos 10°C se utilizó un refrigerador de agua, que fue incapaz de enfriar los volúmenes de agua del circuito abierto utilizados en estos diseños. Otro de los principales problemas encontrados en las instalaciones preliminares fue el de las variaciones diarias de presión de agua, lo que dificultaba la dosificación de tiosulfato sódico.

Cálculo de la cantidad de tiosulfato sódico necesaria para neutralizar el cloro del flujo del agua de Madrid utilizada en los acuarios.

1. *Cloro tóxico en el agua:*

- La concentración media de cloro gas (Cl_2) es de 1mg/l
- Disociación:
$$\text{Cl}_2 \rightleftharpoons \text{Cl}^-\text{H}^+ + \text{Cl}^-\text{O}^-\text{H}^+$$

71 g
cloro gas

35.5 g
cloro disuelto
- La concentración del cloro tóxico (Cl^-O^-) es la mitad de la concentración de cloro gaseoso, 0.5 mg/l.

2. Tiosulfato para neutralizar 0.5 mg/l de cloro tóxico:

- fato para neutralizar 0.5 mg/l de cloro tóxico:*
- Reacción:
$$\text{S}_2\text{O}_3\text{Na}_2 + 4 \text{Cl}^- \longrightarrow 2 \text{SO}_4^{2-} + 4 \text{Cl}^- + 2 \text{H}^+$$

248 g	140 g
tiosulfato sódico sólido	cloro disuelto
- 0.5 mg de cloro tóxico se neutralizan con 0.88 mg de tiosulfato sódico sólido.
- fato para neutralizar 10 l/min de agua:*
- El flujo de cloro tóxico a 10 l/min es de 5 mg/min.
 - La cantidad de tiosulfato necesaria es de 8.8 mg/min.
 - De tiosulfato sódico al 2% (20 g/l) se necesitan 440 µl/min ó 8.8 gotas/min. (1 gota ≈ 50 µl).

TABLA III

Tamaño del tanque, densidad de peces, temperatura del agua y número de cambios por hora de distintos sistemas abiertos utilizados en infecciones experimentales de trucha arco iris con los rhabdovirus de la NHI y de la SHV.

Tamaño tanque l.	Temperatura °C	Nº cambios hora	Densidad truchas g/l.	Peso/ trucha, g.	Virus	Referencia
80	4-21	2.8	0.1	0.3	NHI	Hetrick et al, 1979 (17)
100	4	?	5.6	200	SHV	Neukirch, 1986 (22)
16	8	?	1.5	25	SHV	Neukirch and Glass, 1984 (23)
10	8-12	?	7.5	1-25	SHV	De Kinkelin and Bearzotti, 1981 (12)
6	10	3	8.0	0.5-4	SHV	De Kinkelin and Le Berre, 1977 (11,13)
12	10	1.5	7.0	5	SHV	Diseño preliminar
30	10	2	2.7	2	SHV	Diseño definitivo

?= Los autores no dan el dato. NHI= Necrosis Hematopoyética Infecciosa. El número de cambios por hora se refiere al agua de los tanques.

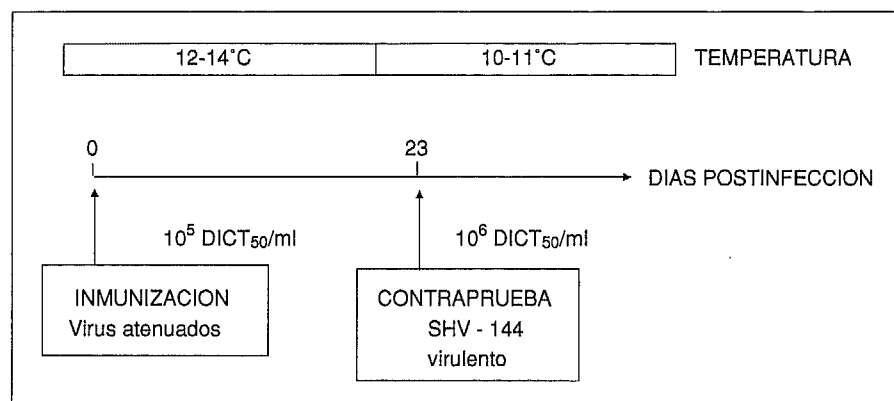


Fig. 4. Esquema de la estrategia del experimento de protección cruzada. Diez acuarios de 30 l se llenaron con 36 truchas de 0.5-1 g por acuario. Después de un período de 20 días de aclimatación a 12-14°C se infectaron con 10^5 DICT₅₀/ml con VHS F₁, F₂, 23.75, 144, 798, 471, 472, 689 y un control si virus. Las truchas resistentes generadas después de la inmunización se contraprobaron 23 días después con el aislado 144 virulento (aislado de trucha) a 10-11°C de temperatura con 10^6 TCID₅₀/ml.

Los acuarios de 12 l de las instalaciones preliminares se cambiaron por otros de 30 l, por considerarlos insuficientes para mantener densidades de peces que fueran estadísticamente significativas (Tabla III). Además se aumentó la renovación de agua de los acuarios a 2 cambios por hora.

Primeros ensayos

Con el fin de comprobar las condiciones de infección, el funcionamiento de la instalación y la virulencia del

aislado 144, se realizaron varias infecciones con este virus en las instalaciones según el diseño preliminar. Se utilizaron truchas de entre 5 y 10 g y se mantuvieron en acuarios de 12 litros a 8°C. La infección se hizo por baño durante 2 h en 1 l de agua conteniendo 105 DTIC₅₀/ml.

Experimentos de protección cruzada

Una vez mejoradas las instalaciones y las condiciones experimentales

de las infecciones, se diseñó un experimento en el que se pudiera estudiar la virulencia y la inmunogenicidad de los virus con los que se ha experimentado en este trabajo. El diseño del experimento (Fig. 4) consta de una primera infección (inmunización) en condiciones benignas con todos los aislados (temperatura alta, dosis baja y virus atenuados) y una contraprueba con virus 144 virulento.

Se utilizaron acuarios de 30 l con 36 alevines de trucha arco iris de 0.5-1 g por acuario. Los peces se infectaron primero mediante baño frío durante 2 horas en 1-2 l de agua con 10^5 DICT₅₀/ml de cada uno de los virus atenuados por 10 pases en EPC: F₁, F₂; 23.75; 144; 689; 798; 471 y 472. A los 23 días post infección se realizó la contraprueba con el virus 144 virulento (aislado de trucha infectada mediante 2 pases por EPC), también mediante baño y a una concentración de 10^6 DICT₅₀/ml. La temperatura del agua durante la primera infección osciló entre los 12 y 14°C, siendo esta temperatura algo elevada para la época del año (Diciembre). Las mortalidades se registraron diariamente, y los peces muertos se congelaron a -40°C hasta que se procesaron para su estudio virológico.

RESULTADOS

Primeros ensayos

A los 7.5 días post-infección la mortalidad alcanzó el 50% de las truchas (Fig. 2). Las truchas afectadas mostraron una alteración de la natación con subidas y bajadas verticales. Se observó un oscurecimiento generalizado de la superficie corporal y ojos saltones (Fig. 3). También se observó la presencia de hemorragias en las aletas y distensión abdominal con presencia de líquido ascítico en esta cavidad.

En otro ensayo, las truchas infectadas, una vez iniciadas las muertes, se aclimataron a 15°C sin que este aumento de la temperatura produjera una reducción de la tasa de mortalidad. En otra experiencia se comprobó

como el virus tratado con Triton x100 (detergente no iónico) al 1% perdía su poder patógeno (Fig. 2). El virus se volvió a aislar en cultivos celulares de EPC a partir de homogeneizados de riñón anterior, bazo e hígado de trucha moribunda a los 9 días post-infección con un título de 8×10^6 DICT₅₀/g de tejido.

Experimentos de protección cruzada

Las bajas mortalidades obtenidas se detallan en la Fig. 5. Sólo con dos virus, el 798 y 472 se superó el 20% de mortalidad, con un 31.9 y un 50% respectivamente. (Fig. 5). Cinco virus (F₁; F₂; 23.75; 689; 471) registraron una mortalidad del 17.7%. De los peces muertos durante la infección se pudo aislar virus en los alevines infectados con los virus 23.75, 798 y 472. Durante la infección los peces comenzaron a mostrar síntomas de la enfermedad al 4º día post-infección, destacando en ellos la alteración de la natación con cambios bruscos de dirección y el oscurecimiento de la superficie corporal. Menos frecuente fue la presencia de hemorragias y de exoftalmia. Los peces infectados con el virus 798 fueron los que mostraron una sitomatología más pronunciada.

El día 19 se registró la última muerte y 4 días después se realizó la contraprueba con el virus 144 virulento sobre los peces supervivientes. Cinco días después se dieron las primeras muertes en el grupo control (peces sin primera infección). Todas las mortalidades se registraron diariamente y se expresaron en porcentaje respecto al número inicial de peces al comienzo de la contraprueba (supervivientes de la primera infección). Las supervivencias a la infección y a la contraprueba se comparan en la Fig. 5. En la contraprueba se consiguieron mortalidades del 100% en los peces control y en los inmunizados con los virus F₁, 23.75 y 471. Para los virus F₂ y 23.75 y para el control, el tiempo en el cual se llegó al 50% de la mortalidad fué el mismo (8,5 días). En los demás casos se observó un retraso en la mortalidad de unos 4-5 días (entre 12,5 y 13,5

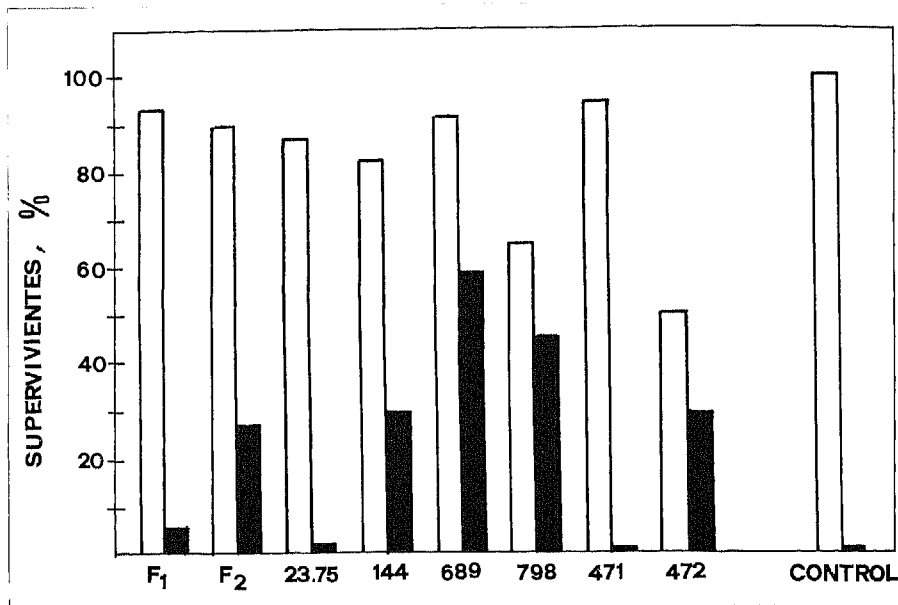


Fig. 5. Supervivientes después de la infección (□) y después de la contraprueba (■). En la Fig. se representan los porcentajes de supervivencia a la infección y a la contraprueba. Se consideró como 100% el número de peces existentes antes de realizar la infección y antes de realizar la contraprueba, respectivamente.

días). De estos grupos (F₂, 144, 689, 798, 471 y 472), a excepción del 471, todos experimentaron del 30 al 60% de supervivencia (Fig. 5).

DISCUSION

A la hora de diseñar instalaciones para las infecciones experimentales hubo que solventar varios problemas que permitieran que los peces estuvieran en condiciones óptimas.

Uno de los sistemas más generalizados es el de los acuarios en sistema cerrado. Estas instalaciones no son las ideales para estudios de infecciones de larga duración. En ellas se acumulan grandes cantidades de nitritos (tóxico para las truchas), por lo que para evitar este problema se utilizan densidades bajas de peces. Estas condiciones dificultan el empleo de cantidades de peces estadísticamente significativas en experimentos comparativos como son los de inmunización y vacunación, por lo que el empleo de acuarios en sistema abierto con renovación constante de agua se hace necesario. Este diseño plantea el problema de la decoloración del agua de ciudad (Madrid). En este trabajo se han probado dos sistemas para resol-

ver este problema: un filtro de carbón activo y la neutralización del cloro con tiosulfato sódico. El filtro de carbono no ha dado resultados óptimos, pues deja pasar cantidades pequeñas de cloro (0.1 mg/l) de efecto tóxico para los alevines de trucha. Además, su saturación y desorción al elevarse las temperaturas en primavera, ocasiona problemas de manejo. El tiosulfato sódico se ha mostrado como un buen sistema para resolver este problema. Por otra parte, la SHV es una enfermedad que se da en aguas frías (8-14°C), lo que en Madrid hacía necesario enfriar el agua durante los meses de Mayo a Noviembre para poder realizar infecciones a lo largo de todo el año. El enfriador de agua utilizado en este trabajo se mostró insuficiente para enfriar a 10°C un flujo de agua de 10 l/min a 20°C, por lo que las infecciones se realizaron durante los meses de Diciembre a Abril.

En las primeras infecciones experimentales con el aislador 144 se pudo comprobar la adecuación de las instalaciones, así como la cinética y otras características de la enfermedad. Tanto la mortalidad, 100%, como la curva de esta se corresponde con lo descrito por otros autores (12, 16). La enferme-

dad cursó de forma aguda la sintomatología fue la característica de la SHV y se pudo aislar el virus a partir de las truchas muertas.

El tiempo después de la infección con el 50% de mortalidad fue de 7.5 días (Fig. 2). Este tiempo es demasiado corto para generar una respuesta inmunitaria en las truchas, por lo que se ensayaron las condiciones experimentales para conseguir que un alto porcentaje de truchas tuviera la oportunidad de generar mecanismos de defensa. Estas condiciones fueron: utilizar aislados atenuados por 10 pases en cultivos celulares, utilizar una dosis media de infección (10^5 DICT₅₀/ml) y utilizar una temperatura moderada 12°-4°C durante la infección. Los supervivientes de esta infección guardarían la información inmunológica para ser contraprobados con un aislado virulento y comprobar así su posible protección.

Se han realizado pocos estudios de variabilidad y comparación de la patogenicidad de los serotipos y aislados de SHV. Vestergard-Jorgensen (1976) (28) estudiando la patogenicidad de aislados del virus de la SHV observó mortalidades que variaban del 50 al 90%, pero la enfermedad evolucionó de forma similar en todos los casos y todos los virus fueron neutralizados por un suero de conejo anti-SHV F₁. Puesto que la comparación de la virulencia de los diferentes serotipos no ha dado resultados diferenciadores, posiblemente debido al curso agudo de la enfermedad, la comparación de virus del grupo de la SHV debe hacerse con experimentos de protección cruzada entre aislados lo que aportará más información acerca de la inmunogenicidad de los virus a estudiar. Al trabajar con alevines de trucha, por ejemplo de 1 g, uno se enfrenta a la dificultad de obtener sangre en una cantidad suficiente, que en técnicas serológicas permita correlacionar los resultados obtenidos *in vivo* con otras pruebas de laboratorio como la neutralización. Por otra parte, no está claro que la neutralización sea la técnica idónea a utilizar puesto que neutraliza-

ción no es sinónimo de protección. En el virus de la SHV se sabe que puede haber protección frente a una contrapueba sin que se detecten anticuerpos neutralizantes (16), pero esta observación no permite aclarar si este estado inmune es debido a una indetectable aunque eficiente respuesta humoral o bien es debido a una respuesta inmune celular. Recientemente, en el virus de la rabia se ha comprobado la importancia que en la protección tiene la respuesta inmune de base celular (15).

En este trabajo se diseñaron experimentos que permitieran comparar la inmunogenicidad de los diferentes aislados frente a uno de ellos escogido como patron comparador. Para ello se hacía necesario la obtención de variantes atenuadas de esos aislados que permitieran obtener truchas inmunizadas con las distintas variantes (11, 13, 17, 19, 22). Mediante pases celulares en una línea celular se puede conseguir esta atenuación de la virulencia. Todos los virus se pasaron 10 veces por la línea celular EPC (una línea celular de ciprinidos) y al infectar a alevines de trucha mostraron pérdida de virulencia (Fig. 5). Sólo dos virus (798 y 472) dieron mortalidades superiores al 20%.

Los alevines supervivientes a la infección con los diferentes virus atenuados se contraprobaron con el virus virulento para ver el grado de protección cruzada que estos virus inducían. Los peces inmunizados con los diferentes virus atenuados mostraron diferentes grados de protección frente al virus virulento. Parece claro que las diferencias encontradas no se deben a la metodología utilizada en el experimento, puesto que es la misma para todos los virus y con unos se logró protección y con otros no. Además, los virus que no confirieron protección frente al virus 144 virulento, F₁ y 23.75 (a excepción del 471) son diferenciables entre sí por sueroneutralización (20). Los datos obtenidos sugieren una mayor semejanza entre el serotipo F₂ con los aislados estudiados que con los serotipos F₁ y 23.75. Lo que no

está tan claro es el hecho de que las diferencias encontradas en la protección (de un 30 a un 60% de supervivientes) no se deban a características intrínsecas de los virus tales como su poder inmunógeno. Así, por ejemplo, los aislados 689 y 798 confirieron una protección mayor frente al virus virulento que frente al virus homólogo atenuado. Parece claro que mediante estos estudios se pueden obtener datos que podrían aclarar los mecanismos inmunológicos contra la SHV, pero sería necesario el profundizar en el conocimiento de la respuesta inmune, tanto de base celular como humoral (25, 26).

La respuesta humoral, más que mediante estudios de sueroneutralización con anticuerpos de conejo, debería estudiarse por medio de pruebas de inmunidad pasiva en la trucha, y la adecuación de técnicas como son las pruebas de estimulación de linfocitos que aportarían, sin duda, más datos sobre la respuesta celular y la memoria inmunológica.

Los estudios de variabilidad *in vivo* mediante infecciones experimentales han revelado la importancia de esta metodología al aportar diferencias, en principio, no esperadas debido a la escasa variabilidad encontrada durante los estudios *in vitro* (1,2).

Se ha demostrado la posibilidad de proteger truchas frente a diferentes variantes del virus de la SHV, lo que favorece el desarrollo de posibles métodos de prevención contra esta enfermedad vírica.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece la cesión del virus VHS-23.75 y el antisero de trucha anti-VHS-07.71 al Dr. De Kinkelin y el virus VHS-F₂, VHS-F₁ y el antisero de conejo anti-VHS-F₁ al Dr. Vestergard-Jorgensen. También se agradece la asistencia técnica de L. Frías y P. Parrilla. Este trabajo fue financiado por la ayuda a la investigación nº 8568 del Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias del Ministerio de Agricultura de España.

Summary: The viral haemorrhagic septicaemia (VHS) is a disease affecting to a number of important species in Aquaculture such as trout, salmon, sea bass, turbot and eel. The present investigation deals with the comparative tests of immunization-challenge of the first isolates of the viral haemorrhagic septicaemia virus in Spain. The virus isolates differ in geographical location, year of isolation and host species and they were compared to the international reference serotypes (F₁, F₂ and 23.75). The results obtained suggest that it will be possible to confer protection to the animals immunized with the different attenuated virus isolates against the challenge with virulent virus and that the spanish isolates are more related to the F₂ serotype rather than to the other serotypes.

BIBLIOGRAFIA

1. Basurco, B., Coll, J.M. Spanish isolates and reference strains of viral haemorrhagic septicaemia virus show similar protein size patterns. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 9:92-95. 1989 (a).
2. Basurco, B., Coll, J.M. Variabilidad del virus de la septicemia hemorrágica viral de la trucha en España. *Med. Vet.* 6:425-430. 1989 (b).
3. Basurco, B., Sanz, F., Estepa, A., Barrera, J., Coll, J.M. La septicemia hemorrágica viral de la trucha: modelo para estudios de vacunación por subunidades. *Bioteología* 5:8-11. 1989.
4. Bovo, G., Giorgetti, G., Jorgensen, V.P.E., Olesen, N.J. Infectious haemopoietic necrosis: first detection in Italy. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 7:27-29. 1987.
5. Castric, J., Kinkelin, P. Occurrence of viral haemorrhagic septicaemia in rainbow trout (*Salmo gairdneri*, R.) reared under sea water. *J. Fish Dis.* 3:21-27. 1980.
6. Castric, J., De Kinkelin, P. Etude expérimentale de la receptivite du Bar (*Dicentrarchus labrax*) et du turbot (*Scophthalmus maximus*) aux infections virales comunes en salmoniculture. Bases Biologiques de l'aquaculture. Montpellier. 1983. IFREMER. Actes de Colloques n°1. 437-444. 1983.
7. Castric, J., Rasschaert, D., Bernard, J. Evidence of lyssaviruses among rhabdovirus isolates from the european eel *anguilla anguilla*. *Ann. Virol. (Inst. Pasteur)* 135:35-55. 1984.
8. Castric, J., De Kikelin, P. Experimental study of the susceptibility of two marine fish species, Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*) and turbot (*Scophthalmus maximus*), to viral haemorrhagic septicaemia. *Aquaculture*, 41:203-212. 1984.
9. Coll, J.M. *Acuicultura Marina Animal*. 3rd. ed. Mundi Prensa. Madrid. 1983.
10. De Kinkelin, P. Le virus d'Egtved. II Purification. *Ann. Rech. Vet.* 3: 199-208. 1972.
11. De Kinkelin, P., Le Berre, M. Demonstration de la protection de la truite arc-en-ciel contre la SHV par l'administration d'un virus inactivé. *Bull. Off. Int. Epiz.* 87:401-402. 1977.
12. De Kinkelin, P., Bearzotti, M. Immunization of rainbow trout against viral haemorrhagic septicaemia (VHS) with a thermoresistant variant of the virus. In International Symposium on fish Biologics: Serodiagnostics and Vaccines. Beeton, VA. USA. *Develop. Biol. Standard*, 49:431-439. 1981.
13. De Kinkelin, P., Le Berre, M. Isolement d'un rhabdovirus pathogene de la truite Fario (*Salmo trutta*, L, 1766) C.R. *Acad. Sc. Paris*, 284:101-104. 1977.
14. De Kikelin, P., Castric, J. An experimental study of the susceptibility of atlantic salmon fry (*Salmo salar*) to viral haemorrhagic septicaemia. *J. Fisch Dis.* 5:57-65. 1982.
15. Dietzschold, B., Wang, H., Rupprecht, C.E., Celis, E., Tollis, M., Ertl, H., Katz, E.H., Kopowski, H. Induction of protective immunity against rabies by immunization with rabies virus ribonucleoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 84:9165-9169. 1987.
16. Gerard, J.P. Technique et resultats d'un essai de vaccination anti-SHV en pisciculture. *Bull. Off. Int. Epiz.* 87:403-404. 1977.
17. Hetrick, F.M., Fryer, J.L., Knittel, M.D. Effect of water temperature on the infection of rainbow trout *Salmo gairdneri*, Richardson, with infectious haematopoietic necrosis virus. *J. Fish Dis.* 2:253-257. 1979.
18. Jimenez de la Fuente, J., Marcote-gui, M.A., Sanjuab, M.L., Basurco, B. Diagnosis of viral diseases in salmonid farms in Spain. *Bull. Eur. Ass. Fish. Pathol.* 271:3-4. 1988.
19. Johnson, K.A., Flynn, J.K., Amend, D.F. Onset of immunity in salmonid fry vaccinated by direct immersion in vibrio anguillarum and yersinia ruckeri bacterins. *J. Fish Dis.* 5: 197-205. 1982.
20. Le Berre, M., De Kinkelin, P., Metzfer, A. Identification serologique des rhabdovirus des salmonides. *Bull. Off. Int. Epiz.* 87:391-393. 1977.
21. Mc Allister, P.E., Owens, W.J. Identification of the three serotypes of viral haemorrhagic septicaemia virus by immunoblot assay using antiserum to serotype F₁. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 7:90-92. 1987.
22. Neukirch, M. An experimental study of the entry and multiplication of viral haemorrhagic septicaemia virus in rainbow trout *salmo gairdneri*, Richardson, after water-borne infection. *J. Fish Dis.* 7:231-234. 1986.
23. Neukirch, M., Glass, B. Some aspects of virus shedding by rainbow trout (*salmo gairdneri*, Rich) after water borne infection with viral haemorrhagic septicaemia (VHS) virus. *Zbl. Bakt. Hyg.* 257:433-438. 1984.
24. Ord, W.M., Le Berre, M., P. De Kinkelin. Viral haemorrhagic septicaemia: Comparative susceptibility of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and hybrids (*S. gairdneri* x *oncorhynchus* Kisutch) to experimental infection. *J. Fish Res. Board Can.* 33: 1205-1208. 1976.
25. Sanchez, C., Domínguez, J., Coll, J.M. Immunoglobulin heterogeneity in the trout *salmo gairdneri* (Richardson) *J. Fis Dis.* 12:459-465. 1989.
26. Sanchez, C., Coll, J.M. La estructura de las inmunoglobulinas de los peces. *Inmunología*, 8:47-55. 1989.
27. Vestergard Jorgensen, P.E. Egtved virus: antigenic variation in 76 virus isolates examined in neutralization tests and by means of the fluorescent antibody technique. *Symp. Zoll. Soc. Lond.* 30: 333-340. 1972.
28. Vestergard Jorgensen, P.E. Partial resistance of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) to viral haemorrhagic septicaemis (VHS) following exposure to non-virulent Egtved-virus. *Nord. Vet. Med.* 28:570-571. 1976.