

MAPEO DE EPITOPOS NEUTRALIZANTES CONTRA EL RABDOVIRUS DE LA SEPTICEMIA HEMORRAGICA VIRICA (SHV) DE SALMONIDOS UTILIZANDO MUTANTES RESISTENTES A ANTICUERPOS MONOCLONALES. APLICACIONES EN LA PREVENCION Y DIAGNOSTICO DE LA ENFERMEDAD

J. COLL

Centro de Investigación en Sanidad Animal (CISA)-INIA
Valdeolmos. 28130 Madrid

RESUMEN

Actualmente, de cinco enfermedades de peces en estudio para su declaración obligatoria a la OIE (1995), tres son causadas por rhabdovirus, de los que el más importante en Europa es el de la septicemia hemorrágica vírica (VSHV). Existen muy pocos anticuerpos monoclonales (AcMS) neutralizantes contra el VSHV, a pesar de su importancia económica mundial para la acuicultura de salmónidos. Introduciendo mejoras técnicas para obtener ratones hiperinmunizados con alto título de anticuerpos policlonales (AcP) neutralizantes anti-VSHV sería posible obtener un panel de AcM neutralizantes contra los distintos serotipos de este virus. Ello permitiría caracterizar las mutaciones resistentes en el virus (mutantes MAR) y los epítomos virales contra los que se dirigen los AcP neutralizantes de la trucha de cara a un mejor diseño de posibles vacunas. Asimismo, los reactivos generados podrán aplicarse a la mejora del diagnóstico de VSHV

PALABRAS CLAVE: Anticuerpos monoclonales neutralizantes
Epítomos
Septicemia hemorrágica viral (SHV)
Salmónidos
Rhabdovirus
Vacunas por subunidades
Diagnóstico, mutantes resistentes
MAR, Anticuerpos neutralizantes de trucha

Importancia actual de los rhabdovirus en acuicultura

Entre todas las patologías de peces, las de mayor repercusión económica son las que provocan mortalidades bruscas, altas y padecidas por adultos. Entre ellas, las causadas por rhabdovirus (Basurco, 1990; Basurco *et al.*, 1990; Estepa, Coll, 1992) son las más importantes, ya que producen las mayores mortalidades bruscas

Recibido: 12-12-94

Aceptado para su publicación: 6-4-95

en varias especies de importancia para la productividad (Estepa, Coll, 1993). Actualmente, las cinco enfermedades de declaración obligatoria según los borradores de la OIE, serán víricas y de ellas tres son causadas por los rhabdovirus SHV, IHN y VPC (OIE, 1995). Se estima entre un 20-40 p. 100 las pérdidas anuales que provocan estas enfermedades en salmoneicultura (Europa, Estados Unidos y Japón). Las enfermedades más importantes producidas por rhabdovirus son la septicemia hemorrágica viral (SHV), la necrosis hematopoiética infecciosa (NHI) y la viremia primaveral de la carpa (VPC). Las dos primeras afectan principalmente a los salmónidos (ambas enfermedades están actualmente catalogadas en la lista B de la OIE, pero también pueden afectar a la lubina (Castric, De Kinkelin, 1984) y al rodaballo (Schlotfeldt *et al.*, 1991).

Existen unas 1.700 granjas de salmónidos en la CEE que en total producen 144.000 t/año. Sólo en Francia la SHV causa el 35 p. 100 de pérdidas anuales en adultos en las áreas infectadas, con una repercusión económica de alrededor de 4.600 MECUS en 1986. El coste potencial de una vacuna para la SHV está estimado en unos 5 MECUS/año (calculado sobre $7,2 \times 10^8$ dosis y un coste estimado de 7 ECUS/1.000 dosis). Una repercusión económica similar tendría la posible vacuna contra la NHI, enfermedad que se está extendiendo hacia España e Italia (Baudin, 1987; Bovo *et al.*, 1987) desde Alemania y Francia, donde ya está tan diseminada como el SHV. El primer brote de NHI en coinfección con IPN ya se asló en España en 1993 (Vilas *et al.*, 1994), y desde entonces se han realizado más aislados (comunicación personal). La amenaza de todos estos rhabdovirus sobre la producción europea es tal, que se está poniendo en marcha un programa de erradicación en la CEE (Doc. 90/1495/EF). El control de las patologías de los peces cultivados está ligado a las recomendaciones de la FAO/OIE (FAO report n.º 192, 1977; Oficina Internacional de Epizootias, OIE Int. Zoo-sanitary code 1986; ICES Coop. Res., Report n.º 159, 1988), a las regulaciones de la CEE (Anon. 1990: 90/C84 y (1/C67) y a la mejora de la productividad de la agricultura y la agroindustria. El mayor impacto de los resultados de estas investigaciones será para aquellas regiones donde la acuicultura pueda tener una gran importancia en el desarrollo rural, ofreciendo un trabajo alternativo a las pesquerías (CEE report 111/121/87). En España la producción de salmónidos se sitúa entre 15.000-20.000 t/año, siendo el potencial total español (incluida la acuicultura marina) de unas 865.000 t/año [revisado en Coll, 1988 #639]. Ello supone de 50 a 70 millones de truchas, lo que implica una aportaciones de 200-400 millones de huevos debido a las mortalidades por varias causas. Al abrir las fronteras con la CEE en 1993, España ha quedado todavía más expuesta a la introducción de estas enfermedades hasta ahora exóticas.

En España se diagnosticaron en el pasado hasta 22 infecciones producidas por VSHV (Basurco, 1990; Basurco *et al.*, 1990), que afectaron a más de 5.000 t de salmón y trucha (producción anual total 15-20.000 t/año). El Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias (INIA) aisló, identificó y estudió cinco brotes de este virus, pero el último aislado es de 1987, por lo que esta enfermedad debe considerarse actualmente ocasional en nuestro país (Basurco, Coll, 1989a; Basurco, Coll, 1989b; Basurco *et al.*, 1989). Sin embargo, la VPC supone una amenaza para la fauna piscícola de nuestros pantanos, como ya se ha demostrado en los primeros brotes registrados en España en los años 1991 y 1992 (Marcotegui *et al.*, 1992).

No existen vacunas ni métodos terapéuticos para ninguna de estas enfermedades. Los métodos de detección de portadores resistentes están todavía en estudio (Estepa, Coll, 1993). Los métodos para serotipaje de aislados se basan en anticuerpos policlonales (Pabs) que exhiben problemas de reactividad cruzada (Basurco, Coll, 1992), ya que no existen apenas anticuerpos monoclonales (AcMS) neutralizantes (Coll, Domínguez-Juncal, 1995) que pudieran ayudar a clasificar estos brotes (Lorenzen, 1992; Mourton et al., 1990; Sanz, Coll, 1992a) (Tabla 1).

TABLA 1
AcM NEUTRALIZANTES CONTRA VHSV DESCRITOS HASTA LA
FECHA

Neutralizing MABs against VHSV described to date

Nombre	Isotipo	País	Referencia
I	IgG ₁	Dinamarca	Lorenzen et al., 1991
C10	IgG _{2a}	Francia	Mourton et al., 1990
1H10	IgG ₁	España	Sanz, Coll, 1991

Estudio de epítomos relevantes en la protección de salmónidos

A pesar de las numerosas investigaciones en los complejos temas de la inmunología celular y de la estructura/biología virales, uno de los grandes problemas en el desarrollo de las vacunas virales por subunidades, tanto humanas como animales, es que no se conocen suficientemente los mecanismos inmunológicos defensivos (Estepa, 1992; Estepa et al., 1994). Este problema es aún mayor en el caso de los peces, y en concreto de la trucha. Por ejemplo, los salmónidos sólo tienen inmunoglobulinas Ig tetraméricas (Sánchez et al., 1989), no se les ha demostrado linfocitos B/T (Estepa, Coll, 1992; Estepa et al., 1992), y aunque se acaba de aislar el gen de la cadena β del receptor de linfocitos T (Partula et al., 1994), y se ha demostrado citotoxicidad específica (Evans et al., 1990; Verlhac et al., 1990), no se han caracterizado diferentes grupos de histocompatibilidad (Kaastrup et al., 1988; Stet, Egberts, 1991) y se desconocen los epítomos virales contra los que se dirigen las respuestas de los salmónidos que les permiten resistir a estas enfermedades (Estepa et al., 1994). El estudio de los AcP de truchas resistentes a infecciones de rhabdovirus y la identificación de los epítomos víricos responsables de poner en marcha los mecanismos de defensa del hospedador, no solamente ayudará al diseño de vacunas, sino que es un primer paso para la mejora de los métodos actuales de diagnóstico (Mourton et al., 1990; Mourton et al., 1992; Sanz, Coll, 1992c).

Los rabdovirus VHSV e VNHI

El VSHV (DeKinkelin, 1972) es similar al rabdovirus de la necrosis hematopoyética infecciosa (NHI) (Koener et al., 1987) de los salmónidos originario de Norteamérica, pero no tienen reacciones cruzadas de seroneutralización.

Ambos rabdovirus se caracterizan por su morfología en forma de bala (Basurco, 1990; Basurco et al., 1990), sus variantes antigénicas, su membrana lipídica y sus proyecciones de glicoproteínas (DeKinkelin, 1972). Su genoma es de unas 11.000 bases de RNA de polaridad negativa, codificando cinco portefnas virales (Basurco, Coll, 1989a; Basurco, Coll, 1989b; Basurco et al., 1989): la polimerasa L (190 Kda), la glicoproteína G (65 Kda), las proteínas de la matriz M_2 y M_1 (25 y 19 Kda, respectivamente) y la nucleocapsida N fosforilada (40 Kda). Nuestro grupo ha descrito una proteína antigénicamente relacionada con la N (N_x), presente sólo en las nucleocápsidas libres del VSHV (Basurco et al., 1991). Estas proteínas se han mapeado en el genoma del VNHI en el orden: 5'L-G- M_2 - M_1 -N 3'. Además se ha descrito una proteína no presente en los viriones, que mapea entre L y G (Kurath et al., 1985) y que está también presente en el VSHV (Basurco, comunicación personal).

La glicoproteína G del VNHI parece ser el único antígeno capaz de inducir una respuesta de anticuerpos neutralizantes *in vitro* contra el virus (Engelking, Leong, 1989; Koener et al., 1987), si bien la nucleoproteína N puede tener efecto coadjuvante (Oberge et al., 1991). Tanto el VSHV inactivado (Estepa, Coll, 1992; Estepa et al., 1992), como las glicoproteínas purificadas del VNHI (Engelking, Leong, 1989) y del VSHV (Bernard et al., 1983) son capaces de inducir una respuesta en salmónidos que les protege de una exposición a dosis letales del virus. Además los AcM neutralizantes contra el VNHI (Ristow et al., 1991; Ristow, Arnzen, 1991) y contra el VSHV (Sanz, Coll, 1992a) reconocen epítomos localizados en la glicoproteína (Lorenzen et al., 1990; Sanz, Coll, 1992c).

Antigenicidad de la glicoproteína G de rabdovirus

Se ha estudiado sobre todo en el virus de la rabia y un poco menos en el virus de la estomatitis vesicular (VSV). La mayoría de los 266 AcM neutralizantes obtenidos contra el virus de la rabia se han mapeado por mutantes MAR en el sitio II (72,5 p. 100), mientras que el resto se distribuye en los sitios III (24,8 p. 100) y los sitios I y IV (Benmansour et al., 1991; Lafon et al., 1983) que no tienen reactividad cruzada (Reagan et al., 1983). Los MAR del sitio II tienen aa mutados en las posiciones entre aa 34-42 o aa 198-200, los MAR del sitio III tienen aa mutados entre los aa 330-338. Sólo uno de los 266 epítomos es lineal, ya que el AcM que lo define sólo reacciona con la glicoproteína G después de estar desnaturalizada.

Sólo un par de estudios se han hecho en la glicoproteína G para mapear las regiones inductoras de AcP neutralizantes (Dietzschold et al., 1982) o inductoras de linfoproliferación (MacFarland et al., 1984). La glicoproteína G purificada se fraccionó en ocho fragmentos mediante rotura con BrCN en sus metioninas. Cada fragmento era capaz de inducir AcP, pero sólo los fragmentos comprendidos entre

aa 20-63, aa 123-198 y 312-342 eran capaces de inducir AcP neutralizantes, coincidiendo con los sitios definidos por los MAR correspondientes. El fragmento aa 123-198 era el único que se inmunoprecipitaba con suero hiperinmune.

El estudio también permitió la localización de algunos puentes disulfuro en la glicoproteína G. Por ejemplo, el péptido aa 208-255 estaba ligado a parte de los péptidos aa 20-63 y aa 264-310, mientras que parte de estos péptidos tenían cisteínas libres. Estos resultados sugieren la existencia de dos conformaciones de la glicoproteína G, probablemente en equilibrio. La primera conformación estaría formada por un bucle grande (aa 20-63 ligado al aa 208-255) conteniendo el péptido más antigénico (aa 123-198) y la segunda conformación contendría un bucle más pequeño (aa 264-310 ligado al aa 208-255). Esta estructura también la sugiere el hecho de que la mayoría de los AcM no ligan péptidos lineales, la reducción de los puentes disulfuro de la glicoproteína G disminuye el 95 p. 100 de su antigenicidad (Dietzschold et al., 1987) y el que 72,5 p. 100 de los AcM que definen el sitio II mapeen en ambos péptidos aa 34-42 y aa 198-200 (ambos dentro del bucle mayor) (Fig. 1). Existe una gran correlación entre los fragmentos inductores de AcP neutralizantes (Dietzschold et al., 1982), la localización de los dos bucles generadores de dos conformaciones (Dietzschold et al., 1982), el mapeo de los mutantes MAR (Benmansour et al., 1991) y las heptadas de aa hidrofóbicos detectadas recientemente (Coll, 1995) (Fig. 1).

La existencia de cuatro sitios no solapantes y no carentes de reactividad cruzada definidos por AcM también se ha demostrado en VSV-Ind (Volk et al., 1982) y en VSV-NJ (Nagata et al., 1992; Vandepol et al., 1986). La reducción de los puentes disulfuro de la glicoproteína G de VSV también inhibe el ligamiento de la mayoría de los AcM neutralizantes. Sin embargo, de 19 AcM obtenidos contra la glicoproteína G del VSV sólo cuatro fueron neutralizantes (Volk et al., 1982) sugiriendo que la estructura responsable es más lábil en VSV que en rabia.

Anticuerpos monoclonales neutralizantes contra el VHSV

Ahora bien, a pesar de los esfuerzos por obtener AcM neutralizantes contra el VSHV sólo existen actualmente AcM obtenidos en Dinamarca (Lorenzen et al., 1990), Francia (Mourton et al., 1990) y nuestro grupo en España (Sanz, Coll, 1992a, 1992b, 1992c). Posiblemente la labilidad del(los) epítipo(s) y la utilización casi exclusiva de selección de hibridomas por ELISA (Lorenzen et al., 1988; Lorenzen et al., 1990) han dificultado hasta ahora la obtención de un mayor número de AcM neutralizantes anti-VHSV (Coll, Domínguez-Juncal, 1995).

Esta situación contrasta con la facilidad de la obtención de AcM contra otros rabdovirus (Benmansour et al., 1991). Por ejemplo, en rabia la mayoría de los AcM contra la proteína G que se obtienen son neutralizantes (Benmansour et al., 1991). Se han descrito más de 250 AcM neutralizantes contra rabia (Benmansour et al., 1991; Flamand et al., 1993) que detectan epítomos conformacionales en la glicoproteína G, mientras que sólo recientemente se han podido aislar AcM neutralizantes que reconozcan epítomos lineales (Bunschoten et al., 1989 #67; Kontseikova et al., 1992; VanderHeijden et al., 1993), situación completamente contraria a lo que sucede en VSHV. Aunque en el virus de la estomatitis vesiculosa (VSV) e IHN ha sido más difícil, tampoco se han encontrado tantas

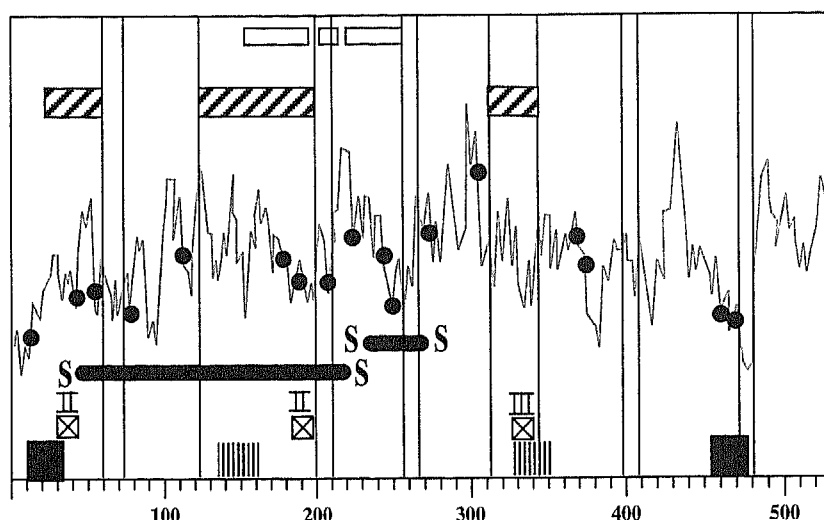


Fig. 1.—Mapa hidrofílico de la glicoproteína G de la rabia cepa ERA (RHRBGD)

Hydrophilic map of the glycoprotein G of the rabies ERA (RHRBGD)

El mapa está confeccionado con el programa ANTIGEN del PCGene (Intelligenetics), de acuerdo con la secuencia de aa (Anilionis et al., 1981). ●, situación de las cisteínas, ■, péptido señal y zona transmembranal. □ □, dominio de ligamento al receptor de acetilcolina (uno de los receptores de rabia). |, rotura con Bromuro de cianógeno (CNBr) por las metioninas (Dietzschold et al., 1982). S—S, puentes disulfuro entre los fragmentos de CNBr que definen el bucle grande y el bucle pequeño. ||||, situación de las heptadas hidrofóbicas de aa (Coll, 1995) □, mutantes MAR sitios II y III. |||||, fragmentos de CNBr capaces de inducir AcM neutralizantes (Dietzschold et al., 1982).

The map has been made with the program ANTIGEN from the PCGene (Intelligenetics) from the sequence aa (Anilionis et al., 1981). ●, localization of cysteins. ■, signal peptide and trasmembrane domain. □ □, binding domain to the acetylcholine receptor (one of the rabies virus receptors). |, breagking by the cainogen bromide (CNBr) by the metionines (Dietzschold et al., 1982). S—S, disulphide bridges between the CNBr fragments defining the big and the small loop. □, MAR mutants sites II and III. |||||, CNBr fragments inducing neutralizing PAbs (Dietzschold et al., 1982)

dificultades como en VSHV y se han descrito varios AcM neutralizantes tanto en VSV (Keil, Wagner, 1989; LeFrancois, 1984; LeFrancois, Lyles, 1982; Nagata et al., 1992), como en VNHI (Eaton et al., 1991; Ristow et al., 1991; Xu et al., 1991). Recientemente se ha publicado el mapeo de varios mutantes resistentes al VNHI en posiciones 78, 218, 276, 408 y 419 (Kim et al., 1994).

Esta situación puede ser debida a una menor proporción de la proteína G en VHSV purificados, bien sea debido al método de purificación o bien a la labilidad de la proteína G del VSHV (Basurco, 1990; Basurco et al., 1990 (Tabla 2). De otra parte, cuando se estudian los protocolos utilizados con rabia, VSV o VNHI para obtener anticuerpos monoclonales y se comparan con los utilizados en el caso de VSHV, se

TABLA 2
CANTIDAD DE LAS GLICOPROTEINAS G DE LOS RABDOVIRUS

Amount of glycoprotein G found in rhabdoviruses

Rabdovirus	G (%)	Referencia
Rabia	29,90	Flamand et al., 1993
VSV	25,07	Wagner et al., 1972
IHN	6,81	Hsu et al., 1985
VHSV	4,39	Basurco, 1990

% Porcentaje molar (número de moléculas) por virión
Molar percentage (number of molecules) per virion

encuentra que siempre se inyecta el virus inactivado con 0,1 p. 100 β -propiolactona (Benmansour et al., 1991), o con 0,06 p. 100 formol (Bachmann et al., 1993), mientras que para VNHI no se utilizan adyuvantes oleosos (Huang et al., 1994).

Protección contra VSHV

Se ha demostrado que el VSHV atenuado por pases en cultivo a alta temperatura pierde virulencia y puede proteger a las truchas contra la infección con VSHV virulento (Bernard et al., 1990). Por otra parte, se ha clonado y secuenciado la proteína G del VNHI y se ha demostrado 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 VNHI (Gilmore et al., 1988). Sin embargo, esfuerzos similares en VSHV con *E. coli* han dado resultados negativos (Estepa et al., 1994; Lorenzen et al., 1993). Resultados preliminares de protección parcial (30-40 p. 100) sólo se han podido conseguir en nuestro laboratorio mediante inmunización *in vivo* con las regiones de N y G de VSHV obtenidas por DNA recombinante en levaduras, conteniendo epítomos reconocidos por un AcM neutralizante e inductores de proliferación celular *in vitro* (Estepa et al., 1994). Estos resultados se han confirmado en otro laboratorio (C. Lecompte, comunicación personal).

Presente y futuro de la prevención contra enfermedades producidas por rabdovirus

El diseño y la mejora de métodos de prevención (vacunas) y diagnóstico de las enfermedades producidas por rabdovirus es necesario, ya que las vacunas existentes actualmente para rabdovirus de peces se basan en cepas atenuadas que no es posible comercializar y los métodos terapéuticos están tecnológicamente lejanos. Además los rabdovirus:

- Causan una mortalidad elevada en adultos, lo que implica una incidencia económica importante. Es una enfermedad que puede dar al traste con toda la

producción en cualquier etapa del cultivo y no sólo en estadios juveniles, como ocurre con otras enfermedades infecciosas de salmonidos (por ejemplo, la extendida necrosis pancreática infecciosa o IPN).

– Los rhabdovirus no afectan sólo a los salmonidos, sino también afectan a otras muchas especies de peces (carpa, anguila, lucio, lubina, rodaballo, etc.), por lo que los conocimientos obtenidos podrán aplicarse a otras especies, cuyo cultivo está adquiriendo importancia en España como el de rodaballo y lubina.

– La vacunación de peces por subunidades antigénicas es un método de prevención cada vez más necesario conforme avanza la acuicultura intensiva. Sin embargo, se desconocen los epítomos virales responsables de su neutralización, debido a la escasez de AcMs neutralizantes obtenidos contra el VHSV (lo que no ocurre con el VNHI, gracias a los esfuerzos desarrollados por los norteamericanos en este área).

– Los avances en esta área facilitarán reactivos para el desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico y ayudará especialmente a resolver el problema de la clasificación de las cepas aisladas.

– La completa identificación de los epítomos hipotéticamente protectores a través de la secuenciación de mutantes MAR y de la competición con AcP de trucha, para su posterior inclusión en las formulaciones inmunizadoras ayudaría a mejorar la situación actual de la protección parcial antes mencionada y podría ayudar a entender los mecanismos de protección existentes en truchas resistentes a la SHV.

SUMMARY

Neutralizing epitope mapping against the haemorrhagic septicaemia rhabdovirus (VHS) of salmonids by monoclonal antibody resistant mutants. Applications to the prevention and diagnosis of the disease

Actually, of the five fish diseases of most possible obligatory certification in the OIE (1995), three are caused by rhabdoviruses, being the viral haemorrhagic septicaemia (VHS) the most important for Europe. There are very few neutralizing monoclonal antibodies (MAbs) against the VHSV in contrast to its major world economic impact to the salmonid aquaculture. By introducing technical refinements to obtain hyperimmunized mice with a high titre of neutralizing polyclonal antibodies (PAbs) anti-VHSV it could be possible to obtain a panel of neutralizing MAbs against the VHSV serotypes. That would make possible to characterize MAb resistant (MAR mutations) and the viral epitopes against which the neutralizing trout Abs are directed to help in the improvement of possible vaccines. At the same time, the generated reagents could be used to improve VHSV serotyping and diagnosis.

KEY WORDS: Neutralizing monoclonal antibodies
Epitopes
Viral haemorrhagic septicaemia (VHS)
Salmonids
Rhabdovirus
Subunit vaccines
Diagnostic
MAR mutants
Neutralizing trout antibodies

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ANILIONIS A., WUNNER W. H., CURTIS P. J., 1981. Structure of the glycoprotein gene in rabies virus. *Nature*, 294, 275-278.
- BACHMANN M. F., KÜNDING T. M., KALBERER C. P., HENGARTNER H., ZINKERNAGEL R. M., 1993. Formalin inactivation of vesicular stomatitis virus imparis T-cell-but not T-help-independent B-cell responses. *Journal Virology*, 67, 3917-3922.
- BASURCO B., 1990. Estudio, identificación y caracterización del virus de la septicemia hemorrágica vírica en España. Universidad Complutense de Madrid (PhD Thesis), 178.
- BASURCO B., COLL J. M., 1989a. Spanish isolates and reference strains of viral haemorrhagic septicaemia virus shown similar protein size patterns. *Bulletin European Association Fish Pathology*, 9, 92-95.
- BASURCO B., COLL J. M., 1989b. Variabilidad del virus de la septicemia hemorrágica viral de la trucha en España. *Medicina Veterinaria*, 6, 425-430.
- BASURCO B., COLL J. M., 1992. In vitro and in vivo immunization with the first viral haemorrhagic septicaemia viruses isolated in Spain compared to international reference serotypes. *Research Veterinary Science*, 53, 93-97.
- BASURCO B., MARCOTEGUI M. A., RUEDA A., TIANA A., CASTELLANOS A., TARAZONA J. V., MUÑOZ M. J., 1990. First report on lymphocystis disease in *Sparus aurata* (Linnaeus in Spain). *Bulletin European Association Fish Pathology*, 10, 71-73.
- BASURCO B., SANZ F., ESTEPA A., BARRERA J., COLL J. M., 1989. La septicemia hemorrágica viral de la trucha: modelo para estudios de vacunación por subunidades. *Biotechnología*, 5, 8-11.
- BASURCO B., SANZ F., MARCOTEGUI M. A., COLL J. M., 1991. The free nucleocapsids of the viral haemorrhagic septicaemia virus contain two antigenically related nucleoproteins. *Archives Virology*, 119, 153-163.
- BAUSIN F. L., 1987. IHN in France. *Bulletin European Association Fish Pathology*, 7, 104.
- BENMANSOUR H., LEBLOIS H., COULON P., TUFFEREAU C., GAUDIN Y., FLAMAND A., LAFAY F., 1991. Antigenicity of rabies virus glycoprotein. *Journal Virology*, 65, 4198-4203.
- BERNARD J., LEBERRE M. B., DEKINKELIN P., 1983. Viral haemorrhagic septicaemia of rainbow trout: relation between the G polypeptide and antibody production of fish after infection with the F25 attenuated avariant. *Infection Immunity*, 39, 7-14.
- BERNARD J., LECOCQ-XHONNEUX F., ROSSIUS M., THIRY M. E., DE KINKELIN P., 1990. Cloning and sequencing the messenger RNA of the N gene of viral haemorrhagic septicaemia virus. *Journal General Virology*, 71, 1669-1674.
- BOVO G., GIORGETTI G., JORGENSEN P. E. V., OLESEN N. J., 1987. Infectious haematopoietic necrosis: first detection in Italy. *Bulletin European Association Fish Pathology*, 7, 62-63.
- BUNSCHOTEN H., KLAPMUT R. J., CLAASSEN I., REYNEVELD S. D., OSTERHANS, A.D.M.E., UTTDEHAAG, F.G.C.M., 1989. Rabies virus-specific human T cells clones provide help for an in vitro antibody response against neutralizing antibody-inducing determinants of the viral glycoprotein. *Journal General Virology*, 70, 1513-1521.
- CASTRIC J., DE KINKELIN P., 1984. Experimental study of the susceptibility of two marine fish species, Sea Bass (*Cicentrarchus labrax* and Turbot) (*Scophthalmus maximus*) to Viral Haemorrhagic Septicaemia. *Aquaculture*, 41, 203-212.
- COLL J. M., 1995. Heptad-repeat sequences in the glycoprotein of rhabdoviruses. *Virus Genes*.
- COLL J. M., DOMINGUEZ-JUNCAL J., 1995. Applications of monoclonal antibodies in Aquaculture. *Biotechnology Advances*, 13, 45-73.
- DE KINKELIN P., 1972. Le virus D'Egtved. II-Purification. *Annals Recherche Vétérinaire*, 3, 199-208.
- DIETZSCHOLD B., TOLIS M., RUPPRECHT C. E., CELIS E., KIPROWSKI H., 1987. Antigenic variation in rabies and rabies-related virus cross-protection independent of glycoprotein mediated virus-neutralizing antibody. *Journal Infectious Diseases*, 156, 815-822.
- DIETZSCHOLD B., WIKTOR T. J., MACFARLAN R., VARRICHIO A., 1982. Antigenic structure of rabies virus glycoprotein: Ordering and immunological characterization of the large CNBr cleavage fragments. *Journal Virology*, 44, 595-602.
- EATON W. D., HULETT J., BRUNSON R., TRUE K., 1991. The first isolation in North America of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) and viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) in coho salmon from the same watershed. *Journal Aquatic Animal Health*, 3, 114-117.

- ENGELKING H., LEONG J. C., 1989. The glycoprotein of Infectious Hematopoietic Necrosis Virus eliciting antibody and protective responses. *Virus Research*, 13, 213-230.
- ESTEPA A., 1992. Estudios de inmunización con proteínas electroeluidas y clonadas del virus de la septicemia hemorrágica vírica de la trucha. Universidad de Madrid (España). Tesis Doctoral, 243.
- ESTEPA A., COLL J. M., 1992. In vitro immunostimulants for optimal responses of kidney cells from healthy trout and from trout surviving viral haemorrhagic septicaemia virus disease. *Journal Fish Shellfish Immunology*, 2, 53-68.
- ESTEPA A., COLL J. M., 1993. Importancia de los rabdovirus en Acuicultura. Estrategias tecnológicas para su prevención y control. *Invest. Agr.: Prod. Sanid. Anim.* Vol 8 (2), 183-196.
- ESTEPA A., FRIAS D., COLL J. M., 1992. Neutralising epitope(s) of the glycoprotein of viral haemorrhagic septicaemia virus are expressed in the membrane of infected trout macrophages. *Bulletin European Association Fish Pathology*, 12, 150-153.
- ESTEPA A., THIRY M., COLL J. M., 1994. Recombinant protein fragments from haemorrhagic septicaemia rhabdovirus stimulate trout leucocyte anamnestic in vitro responses. *Journal General Virology*, 75, 1329-1338.
- EVANS D. L., HARRIS D. T., STATON D. L., FRIEDMAN L. J., 1990. Pathways of signal transduction in teleost nonspecific cytotoxic cells. *Developmental Comparative Immunology*, 14, 295-304.
- FLAMAND A., RAUX H., GAUDIN Y., RUIGROK R. W. H., 1993. Mechanisms of rabies virus neutralization. *Virology*, 194, 302-313.
- GILMORE R. D. J., ENGELKING H. M., MANNING D. S., LEONG J. C., 1988. Expression in *Escherichia coli* of an epitope of the glycoprotein of infectious haematopoietic necrosis virus protects against challenge. *Biotechnology*, 6, 295-300.
- HSU Y. L., ENGELKING H. M., LEONG J. C., 1985. Analysis of the quantity and synthesis of the virion proteins of infectious hematopoietic necrosis virus. *Journal Fish Pathology*, 20, 331-338.
- HUANG C., CHIEN M. S., LANDOLT M., WINTON J., 1994. Characterization of the infectious hematopoietic necrosis virus glycoprotein using neutralizing monoclonal antibodies. *Diseases Aquatic Organisms*, 18, 29-35.
- RAASTRUP P., NIELSEN B., HORLYCK V., SIMONSEN M., 1988. Mixed lymphocyte reactions (MLR) in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) siblings. *Developmental Comparative Immunology*, 12, 801-808.
- KEIL W., WAGNER R. R., 1989. Epitope mapping by deletion mutants and chimeras of two vesicular stomatitis virus glycoprotein genes expressed by a vaccinia virus vector. *Virology*, 170, 392-407.
- KIM C. H., WINTON J. R., LEONG J. C., 1994. Neutralization-resistant variants of infectious hematopoietic virus have altered virulence and tissue tropism. *Journal Virology*, 68, 8447-8453.
- KOENER J. F., PASSAVANT C. W., KURATH G., LEONG J., 1987. Nucleotide sequence of a cDNA clone carrying the glycoprotein gene of Infectious Haematopoietic Necrosis virus, a fish rhabdovirus. *Journal Virology*, 61, 1342-1349.
- KONTSEKOVA E., MACIKOVA I., NOVAK M., DEDEK L., VRZAL V., KONTSEK P., 1992. Conformation-dependent accessibility of the linear epitopes located on the rabies virus glycoprotein. *Viral Immunology*, 5, 213-220.
- KURATH G., AHERN K. G., PEARSON G. D., LEONG J. C., 1985. Molecular cloning of the six mRNA species of infectious hematopoietic necrosis virus, a fish rhabdovirus, and gene order determination by R-loop mapping. *Journal Virology*, 53, 469-476.
- LAFON M., WKTOR T. J., MACFARLAN R. I., 1983. Antigenic sites on the CVS rabies virus glycoprotein: analysis with monoclonal antibodies. *Journal General Virology*, 64, 843-851.
- LEFRANCOIS L., 1984. Protection against lethal viral infection by neutralizing and nonneutralizing monoclonal antibodies: distinct mechanisms action in vivo. *Journal Virology*, 51, 208-214.
- LEFRANCOIS L., LYLES D. S., 1982. The interaction of antibody with the major surface glycoprotein of vesicular stomatitis virus. II. Monoclonal antibody to nonneutralizing and crossreactive epitopes of Indiana and New Jersey serotypes. *Virology*, 121, 168-174.
- LORENZEN N., 1992. Affinity purification of the structural proteins of a fish rhabdovirus by the use of monoclonal antibodies. *Journal Virology Methods*, 38, 297-303.
- LORENZEN N., OLESEN N. J., JORGENSEN P. E. V., 1988. Production and characterization of monoclonal antibodies to four Egtved virus structural proteins. *Diseases Aquatic Organisms*, 4, 35-42.
- LORENZEN N., OLESEN N. J., VESTERGAARD-JORGENSEN P. E., 1990. Neutralization of

- Egtved virus pathogenicity to cell cultures and fish by monoclonal antibodies to the viral G protein. *Journal General Virology*, 71, 561-567.
- LORENZEN N., OLESEN N. J., VESTERGAARD-JORGENSEN P. E., ETZERODT M., HOLTET T. L., THORGERSEN M. C., 1993. Molecular cloning and expression in *Escherichia coli* of the glycoprotein gene of VHS virus and immunization of rainbow trout with the recombinant protein. *Journal General Virology*, 74, 623-630.
- MACFARLAND R. I., DIETZSCHOLD B., WIKTOR T. J., KIEL M., HOUGHTEN R., LERNER R. A., SUTCLIFFE J. G., KIPROWSKI H., 1984. T cell responses to cleaved rabies virus glycoprotein and to synthetic peptides. *Journal Immunology*, 133, 2748-2752.
- MARCOTEGUI M. A., ESTEPA A., FRIAS D., COLL J. M., 1992. First report of a rhabdovirus affecting carps in Spain. *Bulletin European Association Fish Pathology*, 12, 50-52.
- MOURTON C., BEARZOTTI M., PIECHACZYK M., PAOLUCCI F., PAU B., BASTIDE J. M., KINKELIN P. D., 1990. Antigen-capture ELISA for viral haemorrhagic septicaemia virus serotype I. *Journal Virological Methods*, 29, 325-334.
- MOURTON C., ROMESTAND B., DE KINKELIN P., JEFFROY J., LE GOUVELLO R., PAU B., 1992. Highly sensitive immunoassay for direct diagnosis of viral haemorrhagic septicaemia which uses antinucleocapsid monoclonal antibodies. *Journal Clinical Microbiol.*, 30, 2338-2345.
- NAGATA S., OKAMOTO Y., INOUE T., UENO Y., KURATA, CHIBA J., 1992. Identification of epitopes associated with different biological activities on the glycoprotein of vesicular stomatitis virus by use of monoclonal antibodies. *Archives Virology*, 127, 153-168.
- OIE, 1995. Diagnostic manual for aquatic animal diseases. Office International Des Epizooties.
- OBBERG L. A., WIRKKULA J., MOURICH D., LEONG J. C., 1991. Bacterially expressed nucleoprotein of infectious haematopoietic necrosis virus augments protective immunity induced by the glycoprotein vaccine in fish. *Journal Virology* 65, 4486-4489.
- PARTULA S., FELLAH J. S., DE GUERRA A., CHARLEMAGNE J., 1994. Identification of cDNA clones encoding the T-cell receptor beta chain in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Concepts Rendues Academy Sciences Paris*, 317, 765-770.
- REAGAN K. J., WUNNER W. H., WIKTOR T. J., KOPROWSKI H., 1983. Anti-idiotypic antibodies induce neutralizing antibodies to rabies virus glycoprotein. *Journal Virology*, 48, 660-666.
- RISTOW S., LORENZEN N., VESTERGAARD JORGENSEN P. E., 1991. Monoclonal antibody-based immunodot assay distinguishes between viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) and infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV). *Journal Aquatic Animal Health*, 3, 176-180.
- RISTOW S. S., ARNSEN J. M., 1991. Monoclonal antibodies to the glycoprotein and nucleoprotein of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) reveal differences among isolates of the virus by fluorescence, neutralization and electrophoresis. *Diseases Aquatic Organisms*, 11, 105-115.
- SANCHEZ C., DOMINGUEZ J., COLL J. M., 1989. Immunoglobulin heterogeneity in the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *Journal Fish Diseases*, 12, 459-465.
- SANZ F., COLL J. M., 1992a. Neutralizing-Enhancing Monoclonal Antibody Recognizes the Denatured Glycoprotein of Viral Haemorrhagic Septicaemia Virus. *Archives of Virology*, 127, 223-232.
- SANZ F., COLL J. M., 1992b. Techniques for the diagnosis of the viral diseases of salmonids. *Diseases Aquatic Organisms*, 13, 211-223.
- SANZ F. A., COLL J. M., 1992c. Detection of hemorrhagic virus of salmonid fishes by use of an enzyme-linked immunosorbent assay containing high sodium chloride concentration and two concompetitive monoclonal antibodies against early viral nucleoproteins. *American Journal Veterinary Research*, 53, 897-903.
- SCHLOTTFELDT H. J., AHNE W., VESTERGARD-JORGENSEN P. E., GLENDE W., 1991. Occurrence of viral haemorrhagic septicaemia in turbot (*Scophthalmus maximus*)-A natural outbreak. *Bulletin European Association Fish Pathology*, 11, 105-107.
- STET R. J. M., EGBERTS E., 1991. The histocompatibility system in teleostean fishes: From multiple histocompatibility loci to a major histocompatibility complex. *Journal Fish Shellfish Immunology*, 1, 1-16.
- VANDEPOL S. B., LE FRANCOIS L., HOLLAND J. J., 1986. Sequences of the major antibody binding epitopes of the Indiana serotype of vesicular stomatitis virus. *Virology*, 148, 312-325.
- VANDERHEIJDEN R. W. J., LANGEDIJK J. P. M., GROEN J., UYTDEHAAG GF. G. C. M., MELOEN R. H., OSTERHAUS A. D. M. E., 1993. Structural and functional studies on a unique

- linear neutralizing antigenic site (G5) of the rabies virus glycoprotein. *Journal Genral Virology*, 74, 1539-1545.
- VERLHAC V., MIREILLE S., DESCHAUX P., 190. Cytotoxicity of carp (*Cyprinus carpio*) Leucocytes induced against TNP-modified autologous spleen cell and influence of acclimatization temperature. *Develolpmental Comparative Immunology*, 14, 475-480.
- VILAS M. P., RODRIGUEZ S., PEREZ S., 1994. A case of coinfection of IPN and IHN virus in farmed rainbow trout in Spain. *Bulletin European Association Fish Pathology*, 14, 47-50.
- WOLK W. A., NYDER R. M., BENJAMIN D. C., WAGNER R., 1982. MOncloal antibodies to the glycoprotein of Vesicular Stomatitis Virus: Comparative neutralizing activity. *Journal Virology*, 42, 220-227.
- WAGNER R. R., PREVEC L., BRAUN F., SUMMERS D. F., SOKOL F., MCLEOD, 1972. Classification of rhabdovirus proteins: a proposal. *Journal Virology*, 10, 1228-1230.
- XU L., MOURICH D. V., ENGELKING H. M., RISTOW S., ARNZEN J., LEONG J. C., 1991. Epitope mapping and characterization of the infectious hematopoietic necrosis virus glycoprotein, using fusion proteins synthesized in *Escherichia coli*. *Journal Virology*, 65, 1611-1615.

VALORACION DE ESTADIOS PRECOCES DE GESTACION EN OVEJA Y CABRA MEDIANTE ECOGRAFIA TRANSRECTAL

**J. SANTIAGO MORENO
A. GONZALEZ DE BULNES
M. GARCIA LOPEZ
A. LOPEZ SEBASTIAN**

Area de Reproducción Animal. CIT-INIA
Avda. Puerta de Hierro, s/n. 28040 Madrid

RESUMEN

En 33 ovejas Manchegas y 17 cabras Murciano-Granadina se han determinado, mediante ecografía transrectal con sonda de 7,5 MHz, la precocidad y exactitud del diagnóstico precoz de gestación y la determinación del número de embriones, así como los signos de mortalidad embrionaria.

La gestación se diagnostica el día 12 en ovejas y el día 11 en cabras (día 0 = día del celo), por observación de la vesícula embrionaria; detectándose el embrión a los diecinueve días en la oveja y a los dieciséis en la cabra.

La diferenciación entre gestaciones simples y múltiples presenta mayor fiabilidad en la oveja entre los días 19 y 36, y en la cabra entre los días 22 y 30.

Las pérdidas embrionarias tempranas se detectan por la desaparición de un embrión o de su latido cardíaco, apreciándose cuatro de ellas en las ovejas y ocho en las cabras entre los días 19 y 36.

PALABRAS CLAVE: Cabra
Oveja
Ultrasonografía
Embrión
Gestación
Vesícula embrionaria

INTRODUCCION

Los sistemas de diagnóstico de gestación en pequeños rumiantes han ido evolucionando hacia aquellos más precoces y a la vez en tiempo real, dadas sus ventajas económicas y técnicas.

Frente a los sistemas desarrollados en la década de los 70, con la utilización de métodos de diagnósticos basados en las determinaciones hormonales, como es el caso de la progesterona plasmática (Saumande, Thimonier, 1972); la ecografía

Recibido: 12-1-95

Aceptado para su publicación: 1-6-95