

IMPORTANCIA DE LOS RABDOVIRUS EN ACUICULTURA. ESTRATEGIAS TECNOLOGICAS PARA SU PREVENCION Y CONTROL

A. ESTEPA

J. COLL

Dpto. de Sanidad Animal, CISA-INIA
Valdeolmos, 28130 Madrid

RESUMEN

Entre las enfermedades de los peces destacan, por su curso rápido (una semana) y alta mortalidad en adultos (30-50 p. 100 de pérdidas anuales), las producidas por rhabdovirus. Los rhabdovirus afectan, tanto a especies tradicionalmente cultivadas (trucha, salmón), como a especies con perspectivas de futuro desarrollo (lubina, rodaballo) y a especies silvestres en España (carpa, lucio). La vacunación con subunidades víricas antigénicas obtenidas por métodos de ingeniería genética parece ser la única solución tecnológica posible al no aceptarse internacionalmente la utilización de cepas atenuadas debido al peligro de reversión y a la contaminación ambiental. Se han obtenido fragmentos recombinantes de la glicoproteína G y la nucleoproteína N del rhabdovirus causante de la septicemia hemorrágica vírica (SHV) expresados en *Escherichia coli*, *Yersinia ruckeri* (patógeno de salmónidos) y *Saccharomyces cerevisiae*. La inmunización de alevines con las proteínas recombinantes obtenidas en *S. cerevisiae* G4 y N3 fue capaz de inducir un nivel de protección contra la contraprueba vírica similar al que se obtuvo inmunizando con cepas atenuadas. Además estos fragmentos recombinantes fueron capaces de inducir respuestas inmunológicas «in vitro» en leucocitos procedentes de truchas supervivientes a una infección vírica. Estos resultados abren nuevas e importantes perspectivas de investigación en estos temas. La identificación de los epítomos víricos relevantes para la protección y el desarrollo de adyuvantes apropiados para la administración vacunal, son los futuros pasos necesarios para continuar el desarrollo de las posibles vacunas contra estas enfermedades. También está en estudio la utilización de plásmidos expresando proteínas virales como método de inmunización basándose en las técnicas más recientes.

PALABRAS CLAVE: Rhabdovirus
Vacunas
Acuicultura

Importancia de los peces y sus patologías en España y Europa

España es uno de los primeros países del mundo consumidores de pescado (20-40 kg/habitante/año). La mayoría de este pescado proviene de la pesca produciéndose por acuicultura (Coll, 1983) unas 20.000 t de trucha/año y 200.000 t de mejillón/año, siendo el potencial total, incluida la acuicultura marina, de unas 865.000 t/año (Coll, 1988a).

El control de las enfermedades de los peces cultivados está ligado a las recomendaciones de la FAO/OIE (FAO report n.º 192, 1977; OIE Int. Zoosanitary code 1986; ICES Coop. Res., Report n.º 159, 1988) y a las regulaciones de la CE

Recibido: 27-3-92

Aceptado para su publicación: 23-6-93

(Anon. 1990: 90/C84 y 91/C67) para el control de enfermedades cuya diseminación está asociada al comercio de los productos de la piscicultura entre los países comunitarios y de la CE con otros países.

Además, estos temas están relacionados con otras políticas de la CE para el desarrollo de la acuicultura para la cual la CE ha dedicado 66 MECUs/3 años (España 32 MECUs, Francia, 21 MECUs, Portugal, 13 MECUs). El mayor impacto de los resultados de las investigaciones relacionadas con estos temas será para aquellas regiones donde la acuicultura pueda tener una gran importancia en el desarrollo rural, ofreciendo un trabajo alternativo a las pesquerías (CE report 111/121/87).

Importancia de los rhabdovirus en las patologías de los peces cultivados y salvajes

Entre todas las enfermedades de los peces, las de mayor repercusión económica son las padecidas por adultos y, entre ellas, las causadas por rhabdovirus (Coll, 1991b) son las que producen las mayores mortalidades bruscas en varias especies de importancia (Tabla 1). Por ejemplo, la septicemia hemorrágica vírica (SHV) y la necrosis hematopoiética infecciosa (NHI) que afectan principalmente a los salmónidos, y la viremia primaveral de la carpa (VPC) que afecta a la carpa (Marcotegui *et al.*, 1992). No existen vacunas ni métodos terapéuticos para ninguna de estas enfermedades.

Existen unas 1.700 granjas de salmónidos en la CE 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 en base a $7,2 \times 10^8$ dosis y un coste estimado de 7 ECUs/1.000 dosis). Una repercusión similar tendría la posible vacuna contra la NHI que se está extendiendo hacia los Pirineos desde Alemania y otros países europeos y americanos; asimismo, la amenaza se cierne con la VPC sobre la fauna piscícola de nuestros pantanos. La amenaza de estos rhabdovirus sobre la producción europea es tal, que se está poniendo en marcha un programa de erradicación en la CE (Doc. 90/495/EF). En España la producción de salmónidos ha seguido un incremento constante desde 1964 hasta la producción actual que se sitúa entre 15.00-20.000 t/año. Ello supone de 50 a 70 millones de truchas y una importación de 200-400 millones de huevos. Al abrirse las fronteras con la CE en 1993, España ha quedado todavía más expuesta a estas y otras enfermedades de peces. El estu-

TABLA 1
IMPORTANCIA DE LOS RABDOVIRUS DE PECES
Importance of the fish rhabdoviruses

Virus	España	Afecta a	Pérdidas anuales
SHV	Aislados en 1986-89	Salmónidos, lubina, rodaballo	30/50% en Europa
NHI	Exótica (?)	Salmónidos	> 50% en USA
VPC	Aislados en 1991	Carpa (*), lucio	10% en Europa

La NHI se introdujo en Europa en 1987 (Alemania), se detectó en los Pirineos en 1991 y en 1993; *The IHN was introduced in 1987 in Europe (Germany), it was detected in the Pirenees in 1991 and in 1993*
(*) Marcotegui *et al.*, 1992

dio de métodos de prevención (vacunas) de estas enfermedades víricas es necesario, ya que los métodos terapéuticos están tecnológicamente lejanos, además los rabdovirus:

- Causan una mortalidad alta en adultos lo que implica una incidencia económica alta, ya que puede dar al traste con toda la producción en cualquier momento (Coll, 1992a, b) y no sólo en estadios juveniles como en otras enfermedades infecciosas de salmónidos (por ejemplo, la necrosis pancreática infecciosa).
- La SHV es producida por un virus, al igual que otras muchas enfermedades en otros peces, sobre todos marinos (Castric, Kinkelin, 1980). Las conclusiones de estos estudios podrán aplicarse a otras especies, sobre todo marinas, cuyo cultivo en España comenzará en breve a ser importante (rodaballo y lubina).
- La vacunación de peces por subunidades antigénicas (Coll, 1988b) es un método de prevención que se está haciendo necesario conforme avanza la acuicultura intensiva, sin embargo, se desconocen los adyuvantes necesarios así como los antígenos dominantes (epítomos) en la inmunización-vacunación.

Modelo de los estudios inmunológicos: SHV/trucha

Para hacer estos estudios el modelo que se ha escogido es la septicemia hemorrágica vírica de la trucha (Basurco *et al.*, 1989). Por una parte, ello es debido a su importancia económica en acuicultura. Por otra parte, el sistema inmunológico de la trucha es primitivo y, por lo tanto, de una mayor simplicidad. Por ejemplo, los salmónidos sólo tienen inmunoglobinas tetraméricas (Sánchez, Coll, 1989), no se les ha demostrado linfocitos B/T, y no se conocen diferentes grupos de histocompatibilidad. Nuestros estudios se centran en la estructura de las inmunoglobinas (disección antigénica con anticuerpos monoclonales) (Sánchez, 1992; Sánchez *et al.*, 1989, 1991), cultivo «in vitro» de linfocitos (estudio de mitógenos policlonales, análisis clonal y citofluorometría de flujo FACS de poblaciones celulares) (Estepa, Coll, 1991a, b, 1992a, b, c, d, e), inmunización /adyuvantes a través de las branquias e identificación de las dianas celulares de los rabdovirus (Fig. 1). El estudio de la inmunidad frente a virus en un modelo tan primitivo puede ayudar a definir nuevas ideas y estrategias para desarrollar otras vacunas por subunidades.

El virus de la septicemia hemorrágica vírica

El virus de la septicemia hemorrágica vírica (SHV) es un rabdovirus endémico en Europa causante de mortalidades agudas en los salmónidos (Kinkelin, 1972; Jorgensen, 1972). En España, el INIA ha aislado e identificado siete brotes de esta enfermedad de los que se han caracterizado cinco (Basurco, Coll, 1989a, b). El virus de la SHV es similar al virus de la rabia cuya biología molecular se conoce ampliamente y al de la necrosis hematopoiética infecciosa (NHI) de los salmónidos extendido en Norteamérica y extendiéndose actualmente en Europa (Hill, 1975) y muy probablemente en España (comunicación personal). Aunque muy similares (McAllister, Wagner, 1975) los virus del SHV y de la NHI no tienen reacciones cruzadas de seroneutralización (McAllister *et al.*, 1974).

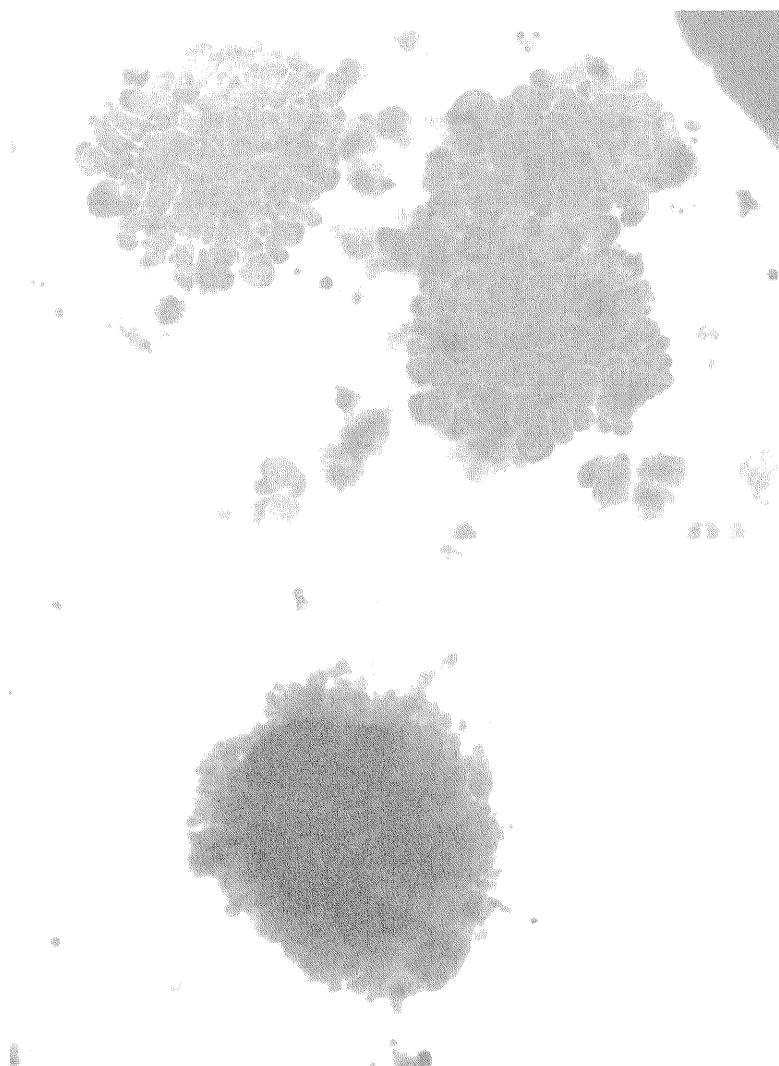


Fig. 1.—Morfología de las colonias de células de riñón de trucha inducidas con fitohemaglutinina (PHA) en coágulos de fibrina. Arriba, en contraste de fase; abajo, después de fijadas y teñidas

Las células de pronefros de trucha arco iris se incubaron con 2 µg/ml de PHA durante 1 semana a 20 °C en coágulos formados con fibrinógeno y trombina. Las colonias una vez fijadas se tiñeron con azul de toluidina (Coll, 1990). La barra señala 500 µm

L: linfocitos; LN: células de núcleo grande (blastos); EN: células de núcleo excéntrico;
MN: células multinucleadas (Estepa, Coll, 1992)

Morphology of the trout kidney colonies induced by phytohemagglutinin (PHA) in fibrin clots.

Up, in phase contrast. Down, after fixing and staining

The cells from rainbow trout pronephros were incubated with 2 µg/ml of PHA during 1 week at 20 °C in clots formed with fibrinogen and thrombin. The colonies were fixed and stained with toluidine blue (Coll, 1990). The bar is 500 µm

*L: lymphocytes; LN: cells with large nuclei (blastos); EN: cells with eccentric nuclei;
MN: multinucleated cells (Estepa, Coll, 1992)*

El virus se transmite horizontalmente a través del agua por los peces infectados y por los portadores persistentemente infectados por el virus (Neukirch, 1986) y verticalmente a través de la superficie de huevos infectados como sucede con el NHI (Mulcahy, Pasho, 1985). El VSHV se caracteriza por su morfología en forma de bala (Kinkelin, 1972), sus tres (quizá cuatro) variantes antigénicas (Jorgensen, 1972; Lenoir, Kinkelin, 1975; McAllister, Owens, 1987; Hill *et al.*, 1975), su membrana lipídica (Kinkelin, 1972) y sus proyecciones de glicoproteínas (Lenoir, Kinkelin, 1975). Sus células diana parecen ser los linfocitos (Estepa, Coll, 1989a, b; Chilmoneczyk, Oui, 1988). Su genoma es de unas 11.000 bases de RNA de polaridad negativa (Robin, Rodríguez, 1977), codificando cuatro proteínas víricas: 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) (Lenoir, Kinkelin, 1975; McAllister, Owens, 1987; Hill *et al.*, 1975; Deuter, Enzmann, 1986; McAllister, Wagner, 1975). Se ha demostrado en las nucleocápsidas libres del VSHV la presencia de una nucleoproteína Nx antigénicamente relacionada con la N (Basurco *et al.*, 1991). Estas proteínas se han mapeado en el genoma del virus de la NHI en el orden: 5'-L-G-M₂-M₁-N3' (Kurath, Leong, 1985); además se ha descrito una proteína no presente en los viriones, que mapea entre L y G (Kurath *et al.*, 1985; Basurco, comunicación personal). La glicoproteína G de NHI parece ser el único antígeno capaz de inducir una respuesta de anticuerpos neutralizadora *in vitro* contra el virus (Gilmore, 1988; Sanz, Coll, 1992a, b). Tanto el virus SHV inactivado (Kinkelin, Le Berre, 1977; Jorgensen, 1981), como las glicoproteínas purificadas de NHI y de SHV son capaces de inducir una respuesta en salmónidos que les protege de una exposición a dosis letales de virus (Gilmore, 1988; Bernard *et al.*, 1983). Sin embargo, estudios recientes en los rabdovirus de la rabia (Dietzschold *et al.*, 1987a, b) y de la SHV (Estepa *et al.*, 1991) han demostrado la participación de la proteína N de la nucleocápsida además de la glicoproteína G en la protección contra la infección (Dietzschold *et al.*, 1987a, b) tanto *in vivo*, como *in vitro* (Fig. 4). Los anticuerpos monoclonales neutralizantes contra NHI (Winton *et al.*, 1988) reconocen epítomos localizados en la glicoproteína. En el caso de SHV todavía se han encontrado pocos anticuerpos monoclonales neutralizantes, atribuyéndose esto a que los protocolos de inmunización utilizados han sido demasiado cortos (Sanz *et al.*, 1992; Lorenzen *et al.*, 1988, 1990). Otros experimentos han demostrado que el virus SHV atenuado por pases en cultivo a alta temperatura pierde virulencia (Bernard *et al.*, 1983; Kinkelin, Bearzotti, 1981). Por otra parte, en el rabdovirus NHI y en el SHV se han clonado y secuenciado la proteína G (Koener, 1987; Thiry *et al.*, 1991a, b) y la proteína N (Bernard *et al.*, 1990). También 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 NHI (Gilmore *et al.*, 1988). Se piensa que el lipopolisacárido de *E. coli* actúa de adjuvante. Además, se ha demostrado que la proteína N es capaz de incrementar la protección obtenida con la proteína G (Oberg *et al.*, 1991).

A pesar de estos estudios, actualmente no hay una vacuna para controlar los brotes de estas enfermedades, lo que ocasiona importantes pérdidas para la acuicultura (Coll, 1988a). Además, los métodos actuales de detección del virus (Sobrino *et al.*, 1989), se basan en procedimientos laboriosos (Coll, 1992a) o no suficientemente sensibles (Cossarini-Dunier, 1985; Coll, 1993b; Sanz, Coll, 1990, 1991a, b, c).

Estrategia de prevención

Debido a que tanto las cepas atenuadas (Kinkelin, Bearzotti, 1981; Kinkelin *et al.*, 1980) como las inactivadas (Kinkelin, Le Berre, 1977) no están aprobadas

por la CE a pesar de producir protección, es por lo que se piensa en el desarrollo de una vacuna por subunidades como estrategia válida de protección (Coll, 1988b). Para ello uno de los primeros problemas que debimos abordar fue el de la variabilidad de VSHV. Sin embargo, pudimos demostrar por medio de un panel de anticuerpos monoclonales (AcM) y estudiando los aislados de distintas regiones geográficas de España, en distintos años y en distintas especies (barbo, trucha y salmón) comparativamente con los representantes de los tres serotipos, que apenas había variabilidad antigénica (Barsuco, 1990; Barsuco, Coll, 1989a, b, 1991, 1992).

Experiencias preliminares, han permitido avanzar algunos aspectos del problema (Estepa, 1992). Se dispone actualmente, de cantidades pequeñas de varias proteínas del VHSV clonadas y expresadas en *E. coli*, levadura y *Y. ruckeri* (N y G) obtenidas en colaboración con Eurogentec (Universidad de Lieja), de algunos adyuvantes desarrollados en nuestro laboratorio (pendiente de Patente) y de epítomos peptídicos con formulación vacunal desarrollada en nuestro laboratorio (pendiente de Patente).

El desarrollo de ensayos *in vitro* (Coll, 1993a; Estepa, Coll, 1992, 1993; Estepa *et al.*, 1992a, b) de la respuesta inmune a los antígenos víricos (Fig. 2) e inmunomoduladores, es una estrategia preliminar antes de efectuar pruebas *in vivo* (Coll, 1990, 1991a) que hemos desarrollado ampliamente. Ello implica un menor número de peces, tiempo más corto por ensayo, el que no influyen las condiciones ambientales y la necesidad de establecer una correlación entre las pruebas *in vivo* e *in vitro*.

Por otra parte, la obtención de vacunas con subunidades víricas obtenidas por ingeniería genética ha estado basada principalmente en la capacidad de las proteínas de superficie víricas para estimular la inmunidad. Pero además, algunas proteínas víricas internas y algunas de las no estructurales son también posibles inductores de inmunidad en ausencia de anticuerpos neutralizantes. Las proteínas no estructurales se expresan en la superficie celular en etapas tempranas del ciclo de replicación y por ello su reconocimiento por el sistema inmune puede hacer de ellas dianas de los primeros mecanismos citotóxicos de destrucción.

Por todo ello, nuestros estudios deben responder a dos preguntas. De una parte, ¿cuáles de las funciones inmunológicas *in vitro/in vivo* deben ser optimizadas? ¿Las defensas no específicas (células adherentes, granulocitos polimorfonucleares), las específicas (linfocitos), o ambas?, y, por otra parte, ¿qué epítomos víricos e inmunomoduladores regulan esa respuesta inmune?

Hasta ahora, hemos demostrado que el VSHV en trucha (*Oncorhynchus mykiss*) (Estepa *et al.*, 1992), grupo de histocompatibilidad reproducible tiene dos proteínas relevantes en la protección: la glicoproteína G y la nucleoproteína N/Nx (Figs. 2, 3). Los trabajos en curso tratan de correlacionar la estructura antigénica (epítomos relevantes en la protección) y la física de estas proteínas (Fig. 4), estudiando: a) el reconocimiento por anticuerpos monoclonales (y por anticuerpos obtenidos en truchas resistentes al virus) de fragmentos peptídicos de la glicoproteína y la nucleoproteína generados por su digestión con proteasas, b) el reconocimiento por linfocitos inmunizados (tanto cooperadores, como citotóxicos) de proteínas virales recombinantes obtenidas en *E. coli*, *Y. ruckeri* (patógeno de salmónidos) y levaduras (en colaboración con M. Thiry, Lieja, Bélgica), c) la localización de epítomos por mapeo peptídico analizando la unión de anticuerpos monoclonales, y la proliferación/lisis de células diana por linfocitos educados y, d) los péptidos víricos presentados por las moléculas de histocompatibilidad de poblaciones celulares procesadoras y presentadoras de antígeno purificadas e infectadas *in vitro* (en un futuro se utilizarán células procedentes de truchas singénicas) para inducir respuestas cooperadoras y/o citotóxicas. Los resultados *in vitro* se están correlacionando con pruebas de protección a la infección *in vivo* en poblaciones de

truchas (Fig. 5) (Estepa, 1992; Estepa *et al.*, 1992a, b). Estos estudios han permitido localizar hasta ahora epítipo(s) citotóxicos de siete aminoácidos en la proteína N. Estudios similares se están comenzando con el VNHI en colaboración con J. Leong (Oregón, USA) (Xu *et al.*, 1991).

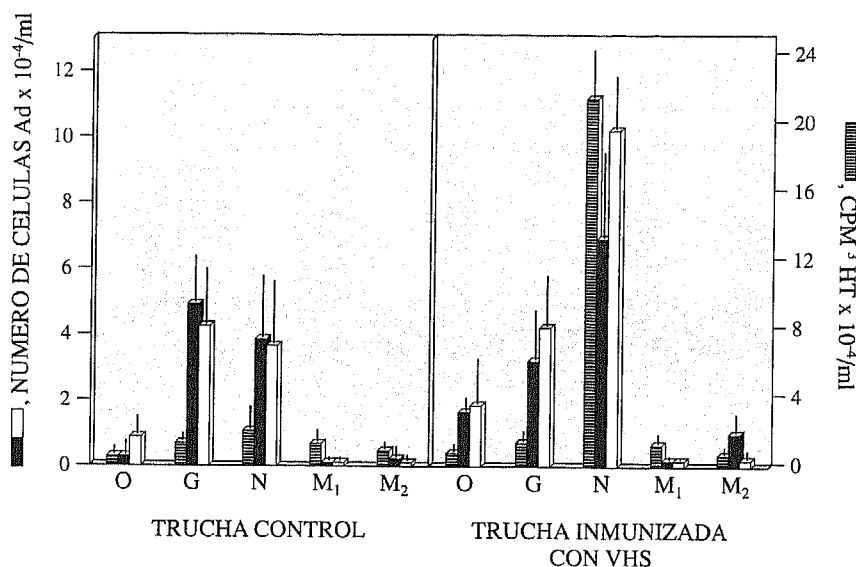


Fig. 2.—Células adherentes (Ad) estimuladas por la adición de proteínas víricas aisladas del VHSV

Las células de pronephros de trucha arco iris se incubaron a una concentración de 240.000 células por ml en coágulos de fibrina a 20 °C en presencia de las proteínas víricas del SHV aisladas por electroforesis preparativa y electroelución. Se usaron truchas testigo y truchas inmunizadas. Las truchas habían sido inmunizadas previamente con SHV purificado por varias inyecciones y usadas 10-12 meses después de la inmunización. Resultados similares se obtuvieron utilizando truchas resistentes a la enfermedad después de 2 infecciones de SHV.

O: testigo; G: 3 µg/ml de la glicoproteína G de SHV; N: 1 µg/ml de la nucleoproteína N/Nx de SHV; M₁: 2 µg/ml de la proteína M₁ de SHV; M₂: 1 µg/ml de la proteína M₂ de SHV. Barras rayadas: incorporación de timidina tritiada en cuentas por minuto (CPM) después de 7 días de incubación a 20 °C. Barras negras: número de células adherentes después de 14 días (otros 7 días de incubación a 14 °C). Barras blancas: número de células adherentes después de 14 días (otros 7 días de incubación a 14 °C en presencia de 10⁶ PFU de VHSV por ml). Las medias y las desviaciones standard de cuatro cultivos se ha representado en la figura

Adherent cells (Ad) stimulated by the addition of isolated viral proteins

The cells from rainbow trout pronephros were incubated at 240,000 cells per ml in fibrin clots at 20 °C in the presence of viral VHSV proteins isolated by preparative electrophoresis and electroelution. Control and immunized trout were used. The trout were immunized previously by injection with purified VHSV and were used 10-12 months after last injection. Similar results were obtained by using survivors of two VHSV infections.

O: control; G: 3 µg/ml of glycoprotein G of VHSV; N: 1 µg/ml of nucleoprotein B/Nx of VHSV; M₁: 2 µg/ml of the protein M₁ of VHSV; M₂: 1 µg of the protein M₂ of VHSV. Striped bars: tritiated thymidine incorporation in counts per minute (CPM) after 7 days incubation at 20 °C. Black bars: number of adherent cells after 14 days (other 7 days incubation at 14 °C). White bars: number of adherent cells after 14 days (other 7 day incubation at 14 °C in the presence of 10⁶ PFU of VHSV per ml). The average and the standard deviations are given in the figure

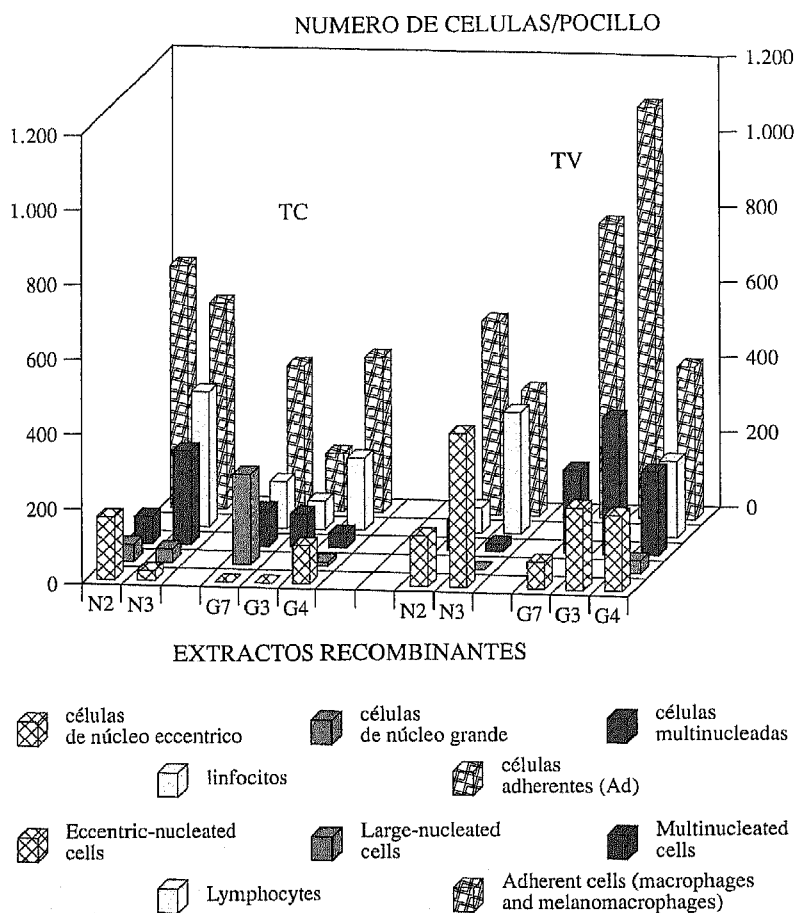


Fig. 3.—Tipos morfológicos de células de riñón de trucha testigo (TC) o de trucha resistente a SHV (TV) estimulados con extractos proteicos de *E. coli* y de *S. cerevisiae* recombinantes productoras de glicoproteínas y nucleoproteínas de SHV

Las células de riñón (24.000/pocillo en 10 μ l) se incubaron a 20 °C durante 10 días en presencia de 50 μ g/ml de extractos proteicos recombinantes. En la figura se representan las medias de 3 truchas diferentes después de restar el número de células presentes en los testigos.

N2: nucleoproteína de SHV expresada en *E. coli*; N3: nucleoproteína de SHV expresada en levadura; G7: glicoproteína de SHV expresada en *E. coli*; G3: glicoproteína de SHV expresada en levadura; G4: glicoproteína de SHV sin péptido señal y sin dominio transmembranal expresada en levadura
Trout kidney morphological cell types stimulated with purified VHSV proteins and recombinant E. coli and yeast protein extracts

Cells (2.4×10^4 /well in 100 μ l) from healthy (TC) or VHSV-resistant (TV) trout were cultured at 20 °C for 10 days in the presence of 50 μ g/ml of protein recombinant extracts from *E. coli* or yeast. Averages from 3 trout are represented, standard deviations have been omitted for clarity.

The counts obtained in control cultures made in the presence of control *E. coli* or yeast extracts have been subtracted from the values shown.

N2: nucleoprotein of VHSV expressed in *E. coli*; N3: nucleoprotein of VHSV expressed in yeast; G7: glycoprotein of VHSV expressed in *E. coli*; G3: glycoprotein of VHSV expressed in yeast; G4: glycoprotein of VHSV without signal peptide and transmembrane domain expressed in yeast.
Cells types were classified as described previously (Coll, 1990; Estepa, Coll, 1992)

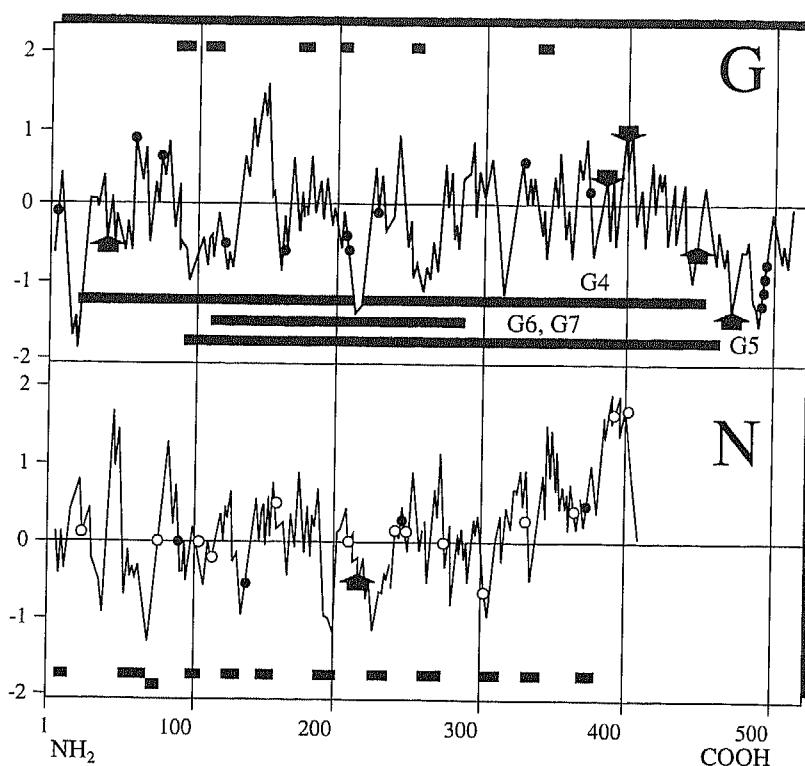


Fig. 4.—Mapas hidrofílicos de la glicoproteína G y de la nucleoproteína N de VHSV a partir de los datos de las secuencias de sus mensajeros

En ordenadas se da la escala relativa de hidrofiliidad (0 a 2) y de hidrofobicidad (0 a -2). En abscisas el número de aminoácidos desde el amino terminal (-NH₂) hasta el carboxilo terminal (-COOH). La presencia de una metionina en posición 13 de la G es posible que indique el verdadero comienzo de la proteína G. Las secuencias que se usaron fueron las publicadas previamente (Bernard *et al.*, 1990; Thiry *et al.*, 1991a). El mapa hidrofílico (...) se obtuvo con el programa antigen (PCGene, Intelligenetics Inc, Geneve, Switzerland) usando una media de grupo de 9 aminoácidos. ●, posiciones de las cisteínas. ○, posiciones de los grupos con alta probabilidad de fosforilación; □, posiciones de los grupos con alta probabilidad de glicosilación; ■, posiciones de los grupos con alta probabilidad de ser epitopos T (seleccionados con el programa TSITES). G4, G6 y Gt, fragmentos de la proteína G expresados en bacterias y levaduras.

Hydrophilicity maps of G and N proteins from VHSV, location of cloned fragments and amphipathic scores

The sequences used were those previously published (Bernard *et al.*, 1990; Thiry *et al.*, 1991a). The hydrophilic map (.....) was obtained by using the Antigen program (PCGene, Intelligenetics Inc., Geneve, Switzerland) using an average group length of 9 amino acids. In ordinates, the relative hydrophilicity scale (0 to 2) and the hydrophobicity scale (0 to -2). In the X axis the number of the amino acids from the amino terminal (-NH₂) to the carboxy terminal (-COOH). The Methionine at position 13 of G is most probably the true beginning of the protein G.

The amphipathic score (.....) was obtained by the Tsites program (Margalit *et al.*, 1983). ●, Location of Cysteins; □, Putative glycosylation signals (Asn-X-Ser/Thr) in the G protein. ○, Putative phosphorylation sites in the N protein. Putative signal sequence peptide (amino acids 3 to 23) and transmembrane anchor domain (amino acids 462 to 482) were only present in the G protein. Other highly probable transmembrane region of the G protein could be located between amino acids 82 to 102.

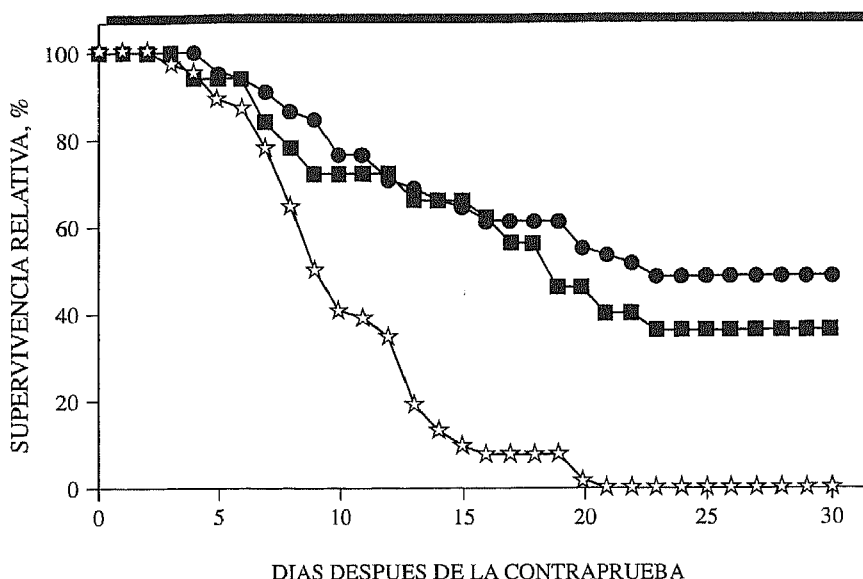


Fig. 5.—Protección parcial contra VHSV obtenida con proteínas recombinantes. Porcentaje relativo de supervivencia de truchas inmunizadas con proteínas recombinantes de SHV después de la contraprueba con VHSV

Treinta y seis truchas de 0,5-2 g de peso se vacunaron por inmersión en una solución de G 6 N en la presencia de PHA.

- , truchas vacunadas con 0,1 $\mu\text{g/ml}$ de extracto de levaduras expresando G4 (80 p.100 de las proteínas) y 1 $\mu\text{g/ml}$ de PHA (media de 2 experimentos); ■—■, truchas vacunadas con 0,1 $\mu\text{g/ml}$ de extracto de levaduras expresando N (5 p.100 de las proteínas) y 1 $\mu\text{g/ml}$ de PHA.
- ★—★, truchas testigo media de 2 experimentos con 1 $\mu\text{g/ml}$ de PHA o con 0,1 $\mu\text{g/ml}$ de extracto de levaduras testigo y 1 $\mu\text{g/ml}$ de PHA.

Relative percent survival of trout immunized with yeast recombinant protein extracts after challenge with virulent VHSV

Thirty six trout of 0.5-2 g body weight were bath-immunized with the recombinant protein extract from yeast G4 and N3 proteins in the presence of phytohemagglutinin (PHA).

- , 36 trout immunized with 0.1 $\mu\text{g/ml}$ of yeast recombinant protein G4 extract and 1 $\mu\text{g/ml}$ of PHA (average 2 experiments); ■—■, 36 trout immunized with 0.1 $\mu\text{g/ml}$ of yeast recombinant protein extract N3 and 1 $\mu\text{g/ml}$ of PHA; ★—★, control 36 control trout, average from two experiments (first experiment, with 1 $\mu\text{g/ml}$ of PHA, second experiment, with 0.1 $\mu\text{g/ml}$ of control yeast non-recombinant protein extract and 1 $\mu\text{g/ml}$ of PHA).

CONCLUSIONES

Aunque los problemas planteados por la vacunación contra las enfermedades víricas de unos animales tan primitivos como los peces, son todavía formidables, es de esperar que entre los resultados de estos estudios se encuentren nuevas ideas. Estas nuevas ideas quizá nos permitan en un futuro, no sólo intentar resolver estos problemas de la acuicultura, sino también contribuir a los métodos de prevención contra otras enfermedades víricas.

AGRADECIMIENTOS

Se agradecen a: Dr. J. Bernard, del CNRS (Jouy-en-Josas, Francia) la cesión de N2, al Dr. C. Ghitti-no, del Instituto Zooprofilático Sperimentale (Torino, Italia) la cesión de *Y. ruckeri* cepa 09 y a M. Thiry, de Eurogentec (Lieja, Bélgica) la cesión de G4 y N3. Se agradece la asistencia técnica de P. Parrilla y D. Frías y la ayuda de J. Coll Pérez en la preparación del manuscrito y sus dibujos. Este trabajo ha sido parcialmente financiado por las ayudas AGF92-0059 de la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (CICYT, España) y por la AIR1-CT92-0036 de la Comunidad Económica Europea.

SUMMARY

Importance of rhabdoviruses in aquaculture. Technological strategies for prevention and control

Among the fish diseases and due to its speed (1 week) and high adult mortalities (30-50 p. 100 of annual losses), the ones caused by rhabdovirus are one of the most importance. The rhabdovirus affect to traditionally cultured species (trout, salmon), to species with a future of culture (sea bass, turbot) and to wild species (carp, pike). The vaccination with viral antigenic subunits obtained by methods of genetic engineering seems to be the only one solution with technological possibilities since the use of the attenuated variants is not allowed by the international community due to the reversion rate and the danger of contamination of the water. Recombinant protein fragments of glycoprotein G and nucleoprotein N from the rhabdovirus causing the viral haemorrhagic septicaemia (VHS of trout were expressed in *Escherichia coli*, *Yersinia ruckeri* (trout pathogen) and *Saccharomyces cerevisiae*. Immunization of fingerling trout with *S. cerevisiae* recombinant proteins N3 and G4 induced a similar level of protection against VHSV challenge to that one obtained by immunization with attenuated strains of VHSV. The protective recombinant protein fragments induced «in vitro» anamnestic responses in leucocyte cultures from survivors of VHSV infection. These results open new and important avenues of research in this subjects. The identification of the viral epitopes relevant to the protection and the development of the necessary adjuvants for immersion vaccination are the future necessary steps further vaccine development against these diseases. The recent introduction of immunization with plasmids expressing viral protein is also under our studies.

KEY WORDS: Rhabdoviruses
Vaccines
Aquaculture

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- BASURCO B., COLL J. M., 1989a. Variabilidad del virus de la septicemia hemorrágica viral de la trucha en España. *Med. Vet.*, 6: 425-430.
- BASURCO B., COLL J. M., 1989b. Spanish isolates and reference strains of viral haemorrhagic septicaemia virus shown similar protein size patterns. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 9: 92-95.
- BASURCO B., 1990. Estudio, identificación y caracterización del virus de la septicemia hemorrágica vírica en España. Universidad Complutense, Madrid, España. Tesis Doctoral. 178 pp.
- BASURCO B., COLL J. M., 1991b. Pruebas de inmunización-protección con los primeros aislados del virus de la septicemia hemorrágica viral de los peces en España. *Med. Vet.*, 8, 341-348.
- BASURCO B., COLL J. M., 1992. In vitro and in vivo variability of the first viral haemorrhagic septicaemia virus isolate in Spain compared to international reference serotypes. *Res. Vet. Sci.*, 53: 93-97.
- 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. *Arch. Virol.*, 119, 153-163.
- 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. *Biotecnología*, 5: 8-11.
- BERNARD J., DE KINKELIN P., BEARZOTTI-LE BERRE M., 1983. «Viral haemorrhagic septicaemia of rainbow trout: relation between the G polypeptide and antibody production on protection of the fish after infection with the F 25 attenuated variant». *Infection and 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. *J. Gen. Virol.*, 71: 1669-1674.
- CASTRIC J., DE KINKELIN P., 1980. Occurrence of viral haemorrhagic septicaemia in rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.) reared under sea water. *J. Fish Dis.*, 3: 21-27.
- COLL J. M., 1990. Estimulación de células de riñón de trucha con mitógenos en cultivos de fibrina. *Inmunología*, 9: 140-145.
- COLL J. M., 1991a. Mantenimiento de líneas celulares de animales poiquilotermos. *Biotecnología*, 7, 5.
- COLL J. M., 1991b. Las enfermedades producidas por virus. Hojas de divulgación. Servicio de Extensión Agraria. 13/90 HO 16 pp.
- COLL J., 1988a. La Acuicultura en España. *Tecnología XXI*, 7: 2-5.
- COLL J., 1988b. Obtención de inmunidad mediante vacunas constituidas por subcomponentes antigénicos de microorganismos. *Inmunología*, 7: 38-48.
- COLL J. M., 1983. *Acuicultura Marina Animal*. Tercera Edición. Edit. Mundi-Prensa. 670 pp. Madrid.
- COLL J. M., 1992a. Diagnóstico de virus en salmónicultura. Peces enfermos o peces portadores. *Investigación Agraria, Prod. Sanid. anim.*, 7: 205-225.
- COLL J. M., 1992b. Kits of enzyme immunoassays in microtitre wells to detect virus and viral antibodies. *Investigación Agraria, Prod. Sanid. anim.*, 7: 47-60.
- COLL J. M., 1993a. Single cell cloning in fibrin clots. In *Protocols in Cell and Tissue Culture*. Ed John Wiley & Sons L., England 4D: 3.1-3.10.
- COLL J. M., 1993b. Técnicas de diagnóstico en Virología. 450 pp. Ed. Díaz de Santos.
- COSSARINI-DUNIER M., 1985. Indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to titrate rainbow trout serum antibodies against two pathogens: *Yersinia ruckeri* and Egtved virus. *Aquaculture*, 49: 197-208.
- DEUTER A., ENZMANN P. J., 1986. Comparative biochemical and serological studies on two fish pathogenic rhabdoviruses (VHS-V and SVC-IV). *J. Vet. Med.*, 33: 36-46.
- DIETZSCHOLD B., WANG H., HEBER-KATZ E., KOPROWSKI H., 1987a. Introduction of protective immunity against rabies by immunization with rabies virus ribonucleo-protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 9165-9169.
- DIETZSCHOLD B., TOLLIS M., RUPPRECHT Ch. E., CELIS E., KOPROWSKI H., 1987b. Antigenic variation in rabies and rabies-related viruses: Cross-protection independent of glycoprotein-mediated virus-neutralizing antibody. *J. Infect. Dis.*, 156: 815-822.
- GILMORE R. D., ENGELKING M., MANNING D. S., LEONG J. C., 1988. Expression in *E. coli* of an epitope of the glycoprotein of infectious haematopoietic necrosis virus protects against viral challenge. *Biotechnology*, 6: 295-300.
- ESTEPA A., 1992. Estudios de inmunización con proteínas electroeluidas y clonadas del virus de la septicemia hemorrágica vírica de la trucha. Universidad Complutense, Madrid. España. Tesis Doctoral. 243 pp.
- ESTEPA A., COLL J. M., 1991a. Infection of trout kidney cells with infectious pancreatic necrosis and viral haemorrhagic septicaemia viruses. *Bull. Eur. Ass. Fish Dis.*, 11, 101-104.
- ESTEPA A., COLL J. M., 1991b. Infection of mitogen stimulated colonies from trout kidney cell cultures with salmonid viruses. *J. Fish Dis.*, 14, 555-562.
- ESTEPA A., COLL J. M., 1992a. In vitro immunostimulants for optimal responses of kidney leucocytes from trout surviving viral haemorrhagic septicaemia virus disease. *J. Fish and Shellfish Immunol.*, 2, 53-68.
- ESTEPA A., COLL J. M., 1992b. In vitro susceptibility of trout kidney macrophages to viral haemorrhagic septicaemia virus. *Viral Immunol.*, 5: 283-292.
- ESTEPA A., FRIAS D., COLL J. M., 1992a. Neutralising epitope(s) of the glycoprotein of viral haemorrhagic septicaemia virus are expressed in the membrane of infected trout macrophages. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 12: 150-153.
- ESTEPA A., FRIAS D., COLL J. M., 1992b. In vitro susceptibility of rainbow trout fin cells to viral haemorrhagic septicaemia virus. *Dis. Aquatic. Organisms*, 15: 35-39.
- ESTEPA A., BASURCO B., SANZ F., COLL J. M., 1991. Stimulation of adherent cells by the addition of purified proteins of viral haemorrhagic septicaemia virus to trout kidney cell cultures. *Viral Immunol.*, 4, 43-52.
- ESTEPA A., COLL J. M., 1992. Mitogen induced proliferation of trout kidney leucocytes in fibrin clots. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 32: 165-177.
- ESTEPA A., COLL J. M., 1993. Properties of blast colonies obtained from head kidney trout in fibrin clots. *Fish and Shellfish Immunol.*, 3: 71-75.
- HILL B. J., 1975. «Physico-chemical and serological characterization of five rhabdoviruses infecting fish». *J. Gen. Virol.*, 27: 369-378.
- HILL B. J., UNDERWOOD B. O., SMALE C. J., BROWN F., 1975. Physico-chemical and serological characterization of five rhabdoviruses infecting fish. *J. Gen. Virol.*, 27: 369-378.

- JORGENSEN P. E. V., 1972. Egtved virus: Antigenic variation in 76 virus isolants examined in neutralization test and by means of the fluorescent antibody technique. Symp. Zool. Soc. Lond., 30: 333-340.
- JORGENSEN P. E. V., 1981. Experimental VHS-Vaccine in field trials. Bull. Ass. Fish. Pathol., 1: 13-14.
- KINKELIN P., 1972. Le virus d'Egtved. II. Purification. Ann. Rech. Veter., 3: 199-208.
- KINKELIN P., BEARZOTTI M., 1981. Immunization of rainbow trout against viral haemorrhagic septicaemia (VHSW) with a thermoresistant variant of the virus. Develop. Biol. Standard, 49: 431-439.
- KINKELIN P., BEARZOTTI M., BERNARD J., 1980. Viral haemorrhagic septicaemia of rainbow trout. Selection of a thermoresistant virus variant and comparison of polypeptide synthesis with the wild-type virus strain. J. of Virology, 36: 652-658.
- KINKELIN P., LE BERRE M. B., 1977. Demonstration de la protection de la truite arc-en-ciel contre la SHV par l'administration d'un virus inactif. Bull. Off. Int. Epiz., 87: 401-402.
- KOENER J. F., PASSAVANT C. W., KURATH G., LEONG J. C., 1987. Nucleotide sequence of a cDNA clone carrying the glycoprotein gene of infectious hematopoietic necrosis virus, a fish rhabdovirus. J. Virol., 61: 1342-1349.
- 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. J. Virol., 53: 469-476.
- KURATH G., LEONG J. C., 1985. Characterization of infections hematopoietic virus in mRNA species reveals a non-virion rhabdovirus protein. J. Virol., 53: 462-468.
- LENOIR G., KINKELIN P., 1975. Fish rhabdoviruses: Comparative study of protein structure. J. Virol., 16: 259-262.
- LORENZEN N., OLESEN N. J., JORGENSEN P. E. V., 1988. Production and characterization of monoclonal antibodies to four Egtved virus structural proteins. Dis. Aquat. Organism., 4: 35-42.
- LORENZEN N., OLESEN N. J., VESTERGARD-JORGENSEN P. E., 1990. Neutralization of Egtved virus pathogenicity to cell cultures and fish by monoclonal antibodies to the viral G protein. J. Gen. Virol., 71: 561-567.
- MARCOTEGUI M. A., ESTEPA A., FRIAS D., COLL J. M., 1992. First report of a rhabdovirus affecting carps in Spain. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol., 12: 50-52.
- Mc ALLISTER P. E., OWENS W. J., 1987. Identification of three serotypes of viral haemorrhagic septicaemia virus by immunoblot assay using antiserum to serotype F1. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol., 7: 90-91.
- Mc ALLISTER P. E., FRYER J. L., PILCHER K. S., 1974. An antigenic comparison between infections hematopoietic necrosis virus (OSV strain) and the virus of haemorrhagic septicaemia of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) (Denmark strain) by cross neutralization, 10: 101-103.
- Mc ALLISTER P. E., WAGNER R. R., 1975. Structural proteins of two salmonid rhabdoviruses. J. Virol., 15: 733-738.
- MOURTON C., BEARZOTTI M., PIECHZACZYK M., PAULUCCI F., PAU B., BASTIDE J. M., DE KINKELIN P., 1991. Antigen-capture ELISA for viral haemorrhagic septicaemia virus serotype I. J. Virol. Methods, 29: 325-334.
- MULCALHY D., PASCHO R. J., 1985. Vertical transmission of infective hematopoietic necrosis virus in sockeye salmon *Oncorhynchus nerka* (Walbaum): Isolation of virus from dead eggs and fry. J. Fish Dis., 8: 393-396.
- NEUKIRCH M., 1986. Demonstration of persistent viral haemorrhagic septicaemia (VHS) virus in rainbow trout after experimental waterborne infection. J. Vet. Med. B., 33: 471-476.
- OBERG L. A., WIRKKULA J., MOURICH D., LEONG J. C., 1991. Bacterially expressed nucleoprotein of infectious hematopoietic necrosis virus augments protective immunity induced by the glycoprotein vaccine in fish. J. Virol., 65: 4486-4489.
- ROBIN J., RODRIGUEZ A., 1977. Purification and biochemical properties of Egtved viral RNA. Can. J. of Microbiol., 23: 1489-1491.
- SANCHEZ C., COLL J. M., DOMINGUEZ J., 1991. One step purification of rainbow trout immunoglobulin. Vet. Immunol. Immunopathol., 27: 383-392.
- SANCHEZ C., DOMINGUEZ J., COLL J. M., 1989. Immunoglobulin heterogeneity in the trout *Salmo gairdneri* (Richardson). J. Fish Diseases, 12: 459-465.
- SANCHEZ C., COLL J. M., 1989. La estructura de las inmunoglobulinas de los peces. Inmunología, 8: 47-55.
- SANCHEZ C., 1992. Análisis estructural y antígeno de las inmunoglobulinas de la trucha arco iris, *Oncorhynchus mykiss*. Universidad Complutense, Madrid. España. 213 pp.
- SANZ F., COLL J. M., 1990. Mayor eficacia y sensibilidad en el diagnóstico de rhabdovirus. Biotecnología, 6: 7-9.
- SANZ F., COLL J. M., 1991a. Diagnóstico de la septicemia hemorrágica viral. Veterinaria in Praxis, 6: 25-32.
- SANZ F., COLL J. M., 1991b. Techniques for the diagnosis of the viral diseases of salmonids. Dis. Aquat. Organism., 13: 211-223.

- SANZ F., COLL J. M., 1991c. Detection of viral haemorrhagic septicaemia virus by ELISA using two non-competitive monoclonal antibodies to the early nucleoproteins at high salt concentration. *Am. J. Vet. Res.*, 53: 897-903.
- SANZ F., COLL J. M., 1992a. Detection of viral haemorrhagic septicaemia virus by direct immunoperoxidase with selected anti-nucleoprotein monoclonal antibody. *Bull. Eur. Ass. Fish Oathol.*, 12: 116-119.
- SANZ F., BASURCO B., BABIN M., DOMINGUEZ J., COLL J. M., 1993. Monoclonal antibodies against the structural proteins of viral haemorrhagic septicaemia virus isolates. *J. Fish Dis.*, 16: 53-63.
- SANZ F., COLL J. M., 1992b. Neutralizing-enhancing monoclonal antibody recognizes the denatured form of the glycoprotein of the viral haemorrhagic septicaemia rhabdovirus of salmonids. *Arch. Virol.*, 127: 223-232.
- SOBRINO F., ESCRIBANO J. M., COLL J. M., 1989. Diagnóstico de virus por amplificación específica y detección no radioactiva. *Biotechnología*, 5, 8-10.
- THIRY M., LECOQ-XHONNEUX F., DHEUR I., RENARD A., DE KINKELIN P., 1991a. Molecular cloning of the m-RNA coding for the G protein of the viral haemorrhagic septicaemia (VHS) of salmonids. *Vet. Microbiol.*, 23: 221-226.
- THIRY M., LECOQ-XHONNEUX F., DHEUR I., RENARD A., DE KINKELIN P., 1991b. Sequence of a cDNA carrying the glycoprotein gene and part of the matrix protein M2 gene of viral haemorrhagic septicaemia virus, a fish rhabdovirus. *Biochim. Biophys. Acta* 1090: 345-347.
- WINTON J. R., ARAKAWA C. K., LANNAN C. N., FRYER J. L., 1988. Neutralizing monoclonal antibodies recognize antigenic variants among isolates of infectious haematopoietic necrosis virus. *Dist. Aquat. Organism.*, 4: 199-204.
- 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*. *J. Virol.*, 65: 1611-1615.