

VARIABLES EN VACUNACION DNA EN EL MODELO TRUCHA-RABDOVIRUS

**M. FERNANDEZ-ALONSO
J. M. COLL**

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

RESUMEN

En este trabajo se revisan la condiciones óptimas para experimentar en vacunación DNA en el modelo trucha/rabdovirus. Se estudian el tamaño óptimo de vacunación, el diseño de plásmidos DNA, el diseño del método de vacunación y las condiciones representativas de la contraprueba. El modelo trucha/rabdovirus se ha escogido principalmente por el impacto actual económico que las rabdovirosis tienen en la Acuicultura intensiva a nivel mundial, no sólo de salmónidos, sino también de otras especies. A pesar de varios años de esfuerzos, y aunque todavía no se dispone de ningún medio eficaz para controlar las rabdovirosis, el reciente desarrollo de la vacunación DNA, hace que esta tecnología abra una nueva esperanza para el posible control de estas enfermedades (Fernández-Alonso *et al.*, 1998).

PALABRAS CLAVE: Vacunación DNA
Trucha/Rabdovirus

IMPACTO ECONOMICO MUNDIAL DE LAS RABDOVIROSIS

El 52% (30,8 millones de dólares en 1991) de la producción de trucha en Estados Unidos se perdió como resultado de enfermedades infecciosas. La mayoría de estas enfermedades estaban causadas por virus (Leong *et al.*, 1995). Las pérdidas anuales debidas al VHSV en Europa se han estimado recientemente alrededor de los 50 millones de Ecus (Olesen, Korsholm, 1997). Cantidades similares y adicionales de pérdidas se estiman que se deben al otro rabdovirus en Europa el IHNV. En Japón se suponen pérdidas del mismo orden de magnitud producidas por los rabdovirus. El modelo escogido trucha /rabdo virus, permite estudios adaptables a todas las especies cultivadas y a otros patógenos puesto que la fisiología de la trucha no es significativamente diferente de las de otras especies.

Recibido: 10-9-98

Aceptado para su publicación: 28-1-99

VENTAJAS DE LAS VACUNAS DNA

La vacunación DNA induce una respuesta inmune contra un antígeno expresado *in vivo* mediante la introducción de su gen en el animal. Tiene las siguientes ventajas:

Síntesis *in vivo* del antígeno. Ello hace posible inmunizar por DNA contra todos aquellos patógenos cuya virulencia y sus respuestas antigénicas sean debidas a una proteína. Ello lleva consigo la generación de respuestas citotóxicas específicas por presentación clase I del antígeno procesado sin el riesgo de generar una verdadera infección. Es semejante en este aspecto a las vacunas vivas atenuadas pero sin sus problemas asociados de reversión.

Expresión continuada del antígeno. La expresión del antígeno continúa por varios días como mínimo, lo que en los modelos animales probados significa una fuerte y duradera respuesta inmunológica celular y humoral sin utilización de una inmunización de recuerdo. En peces hay que tener en cuenta que esto sólo ocurre a la temperatura adecuada y sólo cuando el sistema inmune está maduro.

Inmunidad celular. Los virus y muchos patógenos bacterianos (*Renibacterium* y aeromonas, por ejemplo) son patógenos intracelulares y es difícil producir anticuerpos contra ellos para su neutralización, por lo que requieren inmunidad celular para una máxima protección. Las vacunas DNA son la mejor solución para estos casos.

Inmunización con librerías. La identificación de los antígenos protectores de un patógeno complejo tal como una bacteria, es muy laboriosa. Particularmente ello es más difícil cuando la protección requiere una respuesta celular. Las vacunas DNA permiten el uso del genoma completo para inmunización y procedimientos para identificar dichos antígenos protectores.

Actividad adyuvante del DNA. La presencia de dinucleótidos CpG repetidos en el DNA bacteriano pero ausentes en el DNA eucariótico (Krieg *et al.*, 1995) tiene efectos inmunoestimulatorios. Estos efectos pueden incrementarse adicionando CpG al vector (Sato *et al.*, 1996).

Ventajas económico-prácticas. Las vacunas DNA son de bajo coste y facilidad de fabricación, estables a la temperatura y capaces de ser utilizadas en cualquier especie y edad, tanto de pez, como de patógeno. Es además posible fabricar vacunas multivalentes contra varios patógenos en el mismo o en diferentes plásmidos.

DESARROLLO DEL SISTEMA INMUNITARIO DE LA TRUCHA

En la trucha como en otros peces, después de la eclosión, el sistema linfóide se está desarrollando y no todas las estructuras ni funciones presentes en el adulto están presentes (Grace y Manning, 1980; Tatner y Manning, 1983). Debido a que los rhabdovirus pueden afectar a las truchas desde estos primeros estadios, es importante el poder determinar el momento más temprano desde el que la trucha podría ser vacunada con éxito. Ello es especialmente importante debido a que si se la expone a los antígenos demasiado pronto en el desarrollo, en vez de generar memoria inmunológica se genera tolerancia que bloquea la producción de respuestas (Davidson *et al.*, 1994; Manning *et al.*, 1982; Tatner y Horne, 1984). Además es de interés comercial el vacunar tan pronto como sea posible, porque es más fácil y más barato ya que se necesita menor cantidad de vacuna (Ellis, 1988).

En los peces, animales poiquilotermos, la velocidad del desarrollo de la inmunidad tanto humoral (Tatner, 1986) como celular (Tatner y Manning, 1983), así como el creci-

miento del cuerpo dependen de la temperatura, por lo que es más reproducible hablar de pesos y tamaños en vez de edad.

Los primeros precursores linfoides (células Ig+) se detectan en el saco vitelino 14 días antes de la eclosión (Castillo *et al.*, 1993; Tatner y Manning, 1985). El timo aparece linfoide 3 días después de nacer a 14 °C y después el riñón y el bazo (éste último muy eritrocítico) a los 5-6 días. Cuatro días después de nacer, la última actividad linfoide detectable es la fagocitosis por macrófagos, sobre todo en las branquias, piel e intestinos (Ellis, 1988). Los tejidos linfoides asociados al intestino (GALT) aparecen a los 13 días (Tatner y Manning, 1983; Zapata, 1996).

Los linfocitos T aparecen primero en el timo (máximo tamaño del timo alrededor de 0,5-1g/trucha, aproximadamente a los dos-tres meses de edad a 14 °C, Fig. 1) y luego migran al riñón (Tatner, 1985). Las células Ig+ (linfocitos B) se detectan en el riñón a los cuatro días después de la eclosión pero en el timo y bazo no aparecen hasta los 30 días.

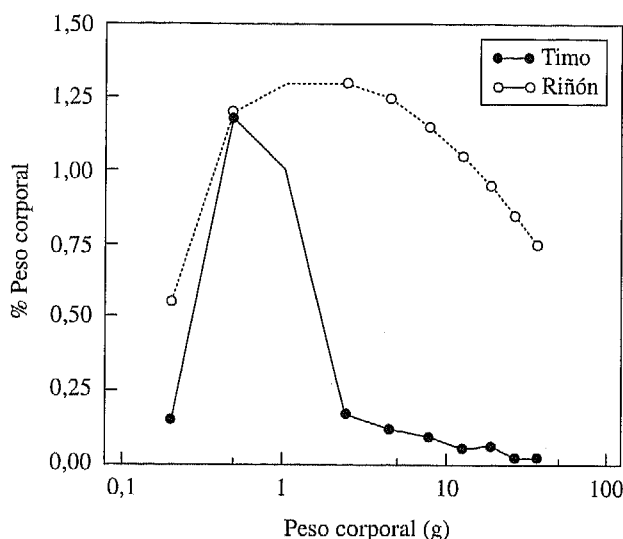


Fig. 1.—Evolución relativa del peso de timo y riñón con el peso corporal de la trucha arco iris. Los datos son de Ellis (Ellis, 1988). Otros autores han publicado datos similares (Tatner y Manning, 1983).

Relative profile of thymus and kidney weight respect to the corporal weight of the rainbow trout. The data are of Ellis (Ellis, 1988) Other authors have published similar data (Tatner y Manning, 1983).

El desarrollo de los órganos linfoides de la trucha estudiados según el peso relativo al resto del cuerpo o al número de células linfoides (Tatner y Manning, 1983), sufren cambios importantes entre los 0,5 a 1 g de peso corporal (entre 3 y 5 cm de longitud, aproximadamente). El desarrollo del timo del que depende el reconocimiento de antígenos timo-dependientes, alcanza su máximo precisamente entre 0,5 y 1 g y luego involuciona (Fig. 1) probablemente debido a la emigración de sus timocitos a otros órganos (Tatner, 1985). Teóricamente, por lo tanto, a partir de 1 g de peso la trucha comenzaría a poder distinguir y reaccionar contra antígenos víricos.

DETERMINACION EMPIRICA DEL MOMENTO OPTIMO PARA VACUNACION

Suficientes datos empíricos para determinar el momento más temprano para la vacunación sólo se han estudiado para yersinia y vibrio (supuestamente antígenos T-independientes). Existen tres aspectos de importancia: la edad más temprana a la que las truchas desarrollan la máxima protección (RPS), la duración de la protección y el efecto de la temperatura.

A 10 °C la mayoría de las especies de salmónidos de $\geq 0,5$ g no desarrollan inmunidad protectora contra yersinia/vibrio. A mayores tamaños se obtienen niveles de protección crecientes hasta que se alcanzan niveles máximos de protección a 2,5 g/pez (Johnson, Flynn, Amend, 1982). Utilizando seis especies de salmónidos se logró definir una curva de RPS respecto al peso corporal. Los mejores RPS se obtuvieron entre 1 y 2,5 g/pez (Fig. 2). Cuando los peces se cultivan a varias temperaturas para variar su ritmo de crecimiento, la protección correlaciona con el tamaño o peso del cuerpo, pero no con su edad, por lo tanto es el tamaño/peso del pez lo que es importante de cara a la vacunación (Johnson, *et al.* 1982; Tatner y Manning, 1983).

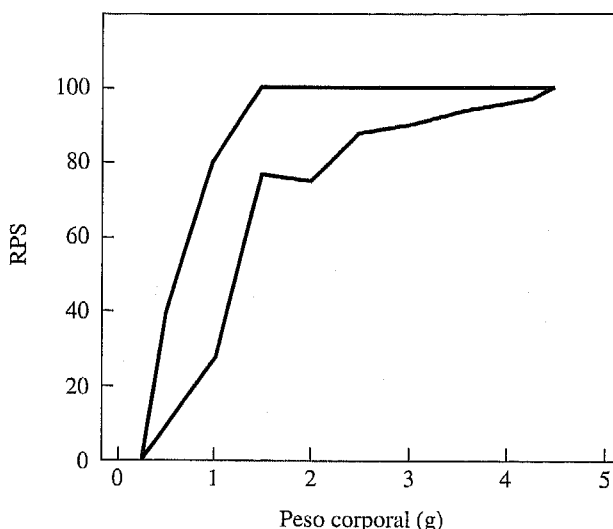


Fig. 2.—Variación del RPS (porcentaje relativo de supervivencia) en función del peso corporal de la trucha. Los datos son de Johnson (Johnson *et al.*, 1982). Seis especies de salmónidos de varios tamaños se vacunaron por inmersión en una bacterina de vibrio diluida 1/10. Los peces se contraprobaron con vibrio anguillarum virulento 30-90 días después de la vacunación. Los resultados se expresan en porcentajes relativos de supervivencia (RPS) = número de peces vacunados supervivientes/número de peces sin vacunar supervivientes $\times 100$. Sólo se han representado las máximas y las mínimas RPS a cada tamaño ensayado prescindiendo de la especie (trucha ó salmón).

Variation of RPS (relative percentage of survival) with the corporal weight of the trout. The data are from Johnson (Johnson *et al.*, 1982). Six salmonid species of several sizes were vaccinated by immersion in a vibrio bacterin diluted 1/10. The fish were challenged with virulent vibrio anguillarum 30-90 days after vaccination. The results are expressed as relative percentage of survival (RPS) = number of vaccinated fish that survived/number of unvaccinated fish that survived $\times 100$. Only maximal and minimal RPS have been represented independently of fish specie (trout or salmon).

La duración de la protección aumenta con el tamaño, 120 días para 1 g/trucha, 180 días para 2g/trucha y alrededor de 1 año para 4g/trucha (duración de la protección en adultos). Es decir, que en truchas >4g la respuesta inmunológica es ya totalmente madura (Fig. 3).

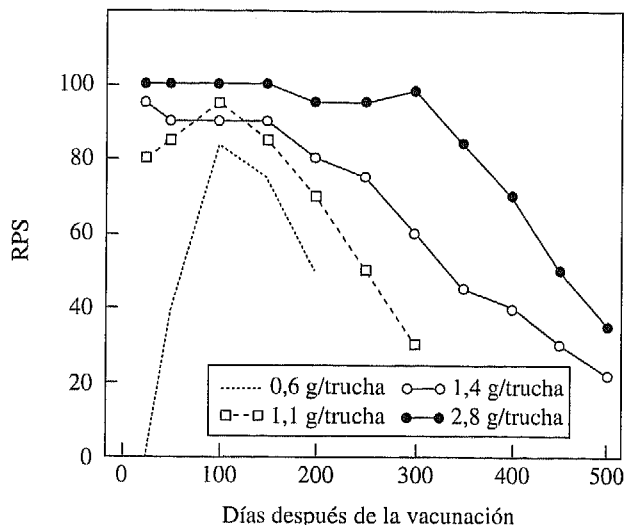


Fig. 3.—Duración de la resistencia a la contraprueba después de la vacunación de truchas a diferentes edades. Los datos son de Johnson (Johnson *et al.*, 1982). Las truchas se vacunaron como en la figura 3.
Duration of the resistance to the challenge after vaccination of trout at different ages. The data are of Johnson (Johnson *et al.*, 1982). The trout were vaccinated as in figure 3.

Truchas inmunizadas por inmersión en aeromonas (antígeno T-independiente) producen anticuerpos cuando son $\geq 0,13$ g/trucha (1 mes a 4-6 °C) pero no desarrollan memoria (aumento de una respuesta secundaria) hasta $\geq 0,26$ g/trucha (2 meses a 4-6 °C). Asimismo, no se observa respuesta de anticuerpos hasta tamaños $\geq 0,26$ g/trucha cuando se emplean proteínas (antígeno T-dependiente) sino que se produce tolerancia a tamaños menores de 0,26 g/trucha (Manning, Grace, Secombes, 1982).

La temperatura tiene un efecto directo en la producción de respuestas inmunes en los peces, sin embargo, no existen suficientes estudios sobre la influencia de este parámetro en la vacunación/protección (Horne *et al.*, 1982).

DISEÑO DE PLASMIDOS

La transferencia directa y expresión de genes reportadores *in vivo* por varias rutas se ha demostrado en peces (Anderson *et al.*, 1996; Gómez-Chiarri *et al.*, 1996; Hansen *et al.*, 1991; Heppell *et al.*, 1998). Incluso se ha demostrado que los músculos de pez son capaces de expresar el DNA inyectado 100 veces más eficientemente que el músculo de ratón. Que la expresión de genes procedentes de patógenos en peces da lugar a reacciones inmunoló-

gicas también se ha demostrado recientemente (Anderson *et al.*, 1996; Heppell *et al.*, 1998). Además las vacunas DNA protegen contra con dos rhabdovirus de peces, el IHNV (Anderson *et al.*, 1996) y el VHSV (Heppell *et al.*, 1998). Casi un 100% de protección se ha obtenido con estas vacunas DNA comparadas un 60% de protección utilizando vacunas de virus inactivados.

Después de la inyección intramuscular de plásmidos, la mayor expresión del antígeno se localiza en las fibras musculares. El trasplante de mioblastos transfectados en ratón ha demostrado que esta expresión es suficiente para inducir respuestas inmunológicas (Ulmer *et al.*, 1996) a través de las células presentadoras de antígeno. De acuerdo con estos datos y con restricciones legislativas, es probable que sea necesario optimizar los vectores DNA para su uso en peces incorporando promotores específicos de músculo en vez de promotores no específicos tales como el de citomegalovirus que es de los mejores promotores que actúan en células de pez (Betancourt *et al.*, 1993). El promotor de la cadena pesada de miosina de carpa y otros promotores relacionados con las cadenas de miosina, tales como el FG2 (Muller y Brem, 1996), permiten la expresión de genes reportadores en músculo de pez (Gauvry *et al.*, 1996), por lo que se están ensayando actualmente en vacunas DNA.

Otro método que se está utilizando para aumentar la respuesta inmunológica de los plásmidos en animales, es la inclusión de genes inmunoestimuladores de la respuesta inmune. La coexpresión del antígeno patógeno y de estos genes inmunoestimuladores llevaría a un incremento y mayor control de las respuestas inmunes. En ratón ya se han comprobado efectos inmunoestimulantes con IL2 y IL4 y efectos supresores con TGF (Raz *et al.*, 1993). En el modelo ratón/rhabdovirus se ha comprobado inmunoestimulación con GM-CSF pero supresión con interferón γ (Xiang y Ertl, 1995). Otros estudios reflejan similares efectos en varios modelos (Davis *et al.*, 1997; Leong *et al.*, 1994; Schijns *et al.*, 1994; Xiang *et al.*, 1997). Un buen uso de estas posibilidades requiere un mayor conocimiento de los efectos e interrelaciones de los inmunoestimuladores, probablemente para cada modelo animal e incluso para cada patógeno. Respecto a su posible uso en peces, sólo la IL1 se ha podido aislar hasta ahora y su uso está muy restringido (Chriss Secombes, comunicación personal).

POSIBLES METODOS PARA DESARROLLAR LAS VACUNAS DNA POR INMERSION

Si bien la vacunación DNA funciona con éxito en el caso de que la aplicación del DNA se haga por inyección intramuscular, ello no supone un método práctico especialmente para peces de pequeño tamaño. Solo la inmersión en DNA facilitaría la aplicación de estas vacunas para esos casos. Ahora bien no parece haber captura del DNA por las truchas después de una inmersión en plásmido disuelto en agua.

Para inducir la captura del DNA por inmersión se necesitan desarrollar nuevos métodos. Como métodos que necesitan ser optimizados, actualmente se trabaja principalmente en: (a) inmersión en complejos DNA-liposomas y (b) inmersión o toma oral de DNA microencapsulado.

Los liposomas catiónicos (capaces de formar complejos con el negativamente cargado DNA) conteniendo lípidos sintéticos tales como el DOTAP (Huang y Li, 1997), están siendo objeto de una investigación concienzuda como sistema de vehiculación de DNA para terapia génica. Como resultado de este área tan activa de investigación, la formulación de liposomas se estudia para obtener una mayor estabilidad y una vehiculación hacia dianas tisulares específicas. La aplicación de estos métodos al campo de la Acuicultura todavía no

se ha intentado (Templeton *et al.*, 1997). Existen liposomas optimizados para administración oral en mamíferos (Klavinkis *et al.*, 1997) y para vacunación por inyección (Davis *et al.*, 1997; Gregoriadis *et al.*, 1997) que también podrían utilizarse en las pruebas por inmersión.

La microencapsulación de DNA se ha usado para aumentar las respuestas de anticuerpos en la mucosa después de la administración oral en ratón (Jones *et al.*, 1997) y se ha reportado inmunización oral de truchas con antígenos proteicos (Lavelle *et al.*, 1997). El DNA encocleado también se está utilizando como posible vehículo (Archibald y Mann, 1994).

Un caso especial de microencapsulación es utilizar la misma bacteria que se usa para clonaje del plásmido. Quizás la gran ventaja de los vectores bacterianos para vehicular vacunas DNA sea debido a que no se requiere purificación de los plásmidos (esencialmente es un vector bacteriano atenuado) por lo que las vacunas se podrían producir al coste de fermentación, liofilización y empaquetado, simplemente. Ya se ha intentado con éxito en mamíferos utilizando *Shigella* (Sizemore *et al.*, 1995). La habilidad de la bacteria *Shigellae* para entrar en las células epiteliales escapando de las vacuolas fagocíticas se ha usado con éxito para dirigir plásmidos al citoplasma de las células para la síntesis proteica y procesamiento antigénico. La bacteria utilizada es defectiva en una enzima esencial para la síntesis de la pared bacteriana (aspartate β -semialdehyde dehydrogenase) y por lo tanto dependiente de ácido diaminopimélico. Experimentos preliminares *in vivo* han demostrado la capacidad de esta cepa de transformar epitelios en cobayas y ratones (Sizemore *et al.*, 1995). Otras bacterias intracelulares tales como *Listeria* o *Reinbacterium* (Maulen *et al.*, 1996) capaces de invadir células y romper la vacuola fagocítica dentro del citoplasma, podrían utilizarse como vectores de los plásmidos para vacunas DNA. Se podría intentar con otras bacterias endocelulares, patógenos habituales en Acuicultura (*Renibacterium*, *Aeromonas*, etc.). A este respecto, la transformación de yersinia (Cutrin *et al.*, 1994) y la identificación y clonaje de un fragmento de DNA asociado con las propiedades de internalización de *Renibacterium* en células de pez (Maulen *et al.*, 1996), así como el uso de mutantes de aeromonas (Noonan *et al.*, 1995), son avances o nuevos datos que se podrían aprovechar para nuevos desarrollos en vacunas DNA.

POSIBLES MODELOS *IN VITRO*

Cualesquiera que sean los métodos empleados para hacer llegar el plásmido codificante del antígeno patógeno al tejido *in vivo*, experimentos paralelos *in vitro* con algunos modelos tisulares podrían añadir algunas ideas o mejoras. Las variables *in vitro* podrían optimizarse de cara a los experimentos *in vivo*. Puesto que *in vitro* siempre se pueden ensayar muchas más variables, deberíamos de ser capaces de seleccionar aquellas que luego podrán ser utilizadas *in vivo*.

La posible diana celular del DNA por inmersión no se conoce todavía. En principio se podría pensar en: a) Usar una línea celular epitelial componente mayoritario de las branquias y de la piel (por ejemplo, la línea celular EPC). b) Puesto que los macrófagos son células abundantes en las branquias, fagocitan antígenos bacterianos (Zapata *et al.*, 1987) y se pueden obtener fácilmente *in vitro* (Estepa *et al.*, 1991; Estepa y Coll, 1991), están entre las células que con mayores probabilidades podrían captar el DNA. c) Ya que las branquias son la más grande superficie del pez en contacto con el agua y tienen menor cantidad de mucus que

el resto de su superficie, tienen por lo tanto la mayor probabilidad de captar DNA. Se ha demostrado que las células epiteliales de las branquias capturan *Yersinia* (Zapata *et al.*, 1987).

INVESTIGACION DE LAS RUTAS DE ENTRADA

Aún después de muchos años de experimentación se desconocen las rutas de entrada de los antígenos proteicos en los peces después de una inmersión en ellos. Las posibles rutas de entrada del DNA son por lo tanto totalmente desconocidas. El estudio de la distribución del DNA, una vez puesto en contacto con la trucha por inmersión puede ayudar a definir la ruta de entrada aportando nuevas ideas para su optimización. La localización de DNA marcado radioactivamente puede seguirse fácilmente con el tiempo, además podría detectarse el DNA específico mediante amplificación con PCR en distintos tejidos así como la presencia del antígeno expresado por inmunohistología.

INVESTIGACION DE LOS ANTIGENOS PROTECTORES

Aunque las vacunas-DNA codificadoras tanto del gen G como del gen N de VHSV ensayadas fueron efectivas protegiendo truchas contra la contraprueba, la construcción G fue más eficaz llegando casi al 100%. En el caso de las cinco proteínas que forman los rabdovirus está claro que el mejor antígeno protector a utilizar es la proteína G y quizá también la N. Ahora bien, para aquellos patógenos (por ejemplo, *Aeromonas*) para los que poco se conoce acerca de los antígenos protectivos, se puede emplear la técnica ELI (expresión library immunization) (Barry *et al.*, 1995) para identificarlos. El tamaño del genoma de estas bacterias es de 1.5×10^6 pares de bases y por lo tanto requiere el screening de unos 5000 clones para identificar cuales de ellos codifican anticuerpos protectores. Una estrategia para disminuir el número de ensayos puede ser el analizarlos por grupos y/o seleccionar para estudiar sólo aquellos clones que se expresan *in vivo* (preparando cDNA del RNA mensajero obtenido de *aeromonas* crecidas "in situ" en el pez).

ANALISIS DE LAS RESPUESTAS INMUNES

Las respuestas inmunes inducidas contra los rabdovirus en peces, pueden evaluarse por ELISA, microneutralización e inmunoproliferación anamnésica. La inducción de anticuerpos totales contra la G del VHSV por medio de ELISA indirecto (Sanz y Coll, 1992a; 1992b) se ensaya utilizando G4 recombinante producida en levadura (Estepa *et al.*, 1994) y el anticuerpo monoclonal 1G7 anti-IgM de trucha que reconoce específicamente la mayoría de las especies moleculares de inmunoglobulinas de salmónidos (Sánchez *et al.*, 1991). Los anticuerpos neutralizantes anti-VHSV pueden ensayarse por medio de un ensayo de microneutralización desarrollado recientemente (Lorenzo *et al.*, 1996) que permite no sólo una estimación rápida (1 día), sino también una pequeña cantidad de suero (10 µl) tal que se pueden ensayar hasta las truchas más pequeñas. Los ensayos de inmunoproliferación anamnésicos (Estepa *et al.*, 1994; Lorenzo *et al.*, 1995a; 1995b) al contrario que los anticuerpos neutralizantes que duran en la sangre sólo unos 2-3 meses (Fig. 4), duran más de 1 año (Estepa *et al.*, 1996; 1998), lo que hace que estos ensayos sean mejores para estimar

la duración de la vacunación. Brevemente, los leucocitos de riñón anterior de truchas individuales se cultivan en condiciones y medio especiales en presencia de G4 recombinante para estimar el valor de estimulación de las respuestas inmunoproliferativas a distintos tiempos después de la vacunación.

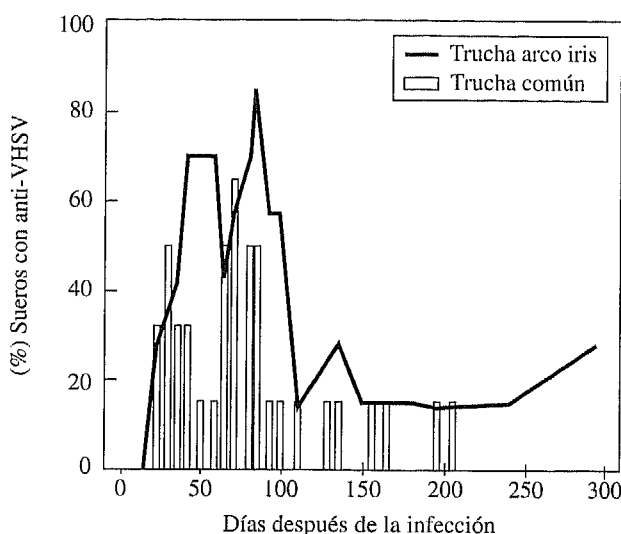


Fig. 4.—Duración de los niveles de anticuerpos neutralizantes anti-VHSV después de una infección. Truchas de 15-18 cm se infectaron con VHSV durante 2 h a 12 °C con 330 DICT50/ml. La mortalidad fue nula en el caso de seis truchas comunes y del 60% en el caso de trucha arco iris. La sangre se extrajo de los 6 y 7 animales supervivientes, respectivamente, durante 1 año y se estimaron los anticuerpos neutralizantes. Se expresa el porcentaje de sueros que fueron positivos a cada tiempo. Datos de Enzman y Konrad (Enzmann y Konrad, 1993).

Duration of the anti-VHSV neutralizing antibody levels after infection. Trout of 15-18 cm were infected with VHSV during 2 h at 12 °C with 330 DICT50/ml. The mortality was negligible in the case of 6 common trout and of the 60% in the case of rainbow trout. The blood was extracted in 6 and 7 survivor fish during 1 year and neutralizing antibodies were estimated. The percentage of the serum that were positive at each time is expressed in the figure. Data from Enzman and Konrad (Enzmann and Konrad, 1993).

DISEÑO DE LAS CONTRAPRUEBAS

Las contrapruebas se deberían hacer con varias concentraciones de patógenos, para así escoger para la experimentación de laboratorio aquella dosis de virus que mate un 50% de las truchas (Engelking *et al.*, 1991). Ahora bien, para pocos patógenos se han hecho estos estudios. Para IHNV con truchas de 0,4-1g dichos niveles de virus están entre 100-10000 DICT50/ml. Curvas típicas se muestran en la Figura 5 para controles no vacunados. Dependiendo de la virulencia del aislado viral, los peces vacunados tienen mortalidades menores. Mortalidades que expresadas en porcentajes relativos de supervivencia o RPS ($RPS = 1 - \text{mortalidades de los vacunados} / \text{mortalidades de los no vacunados} \times 100$) van de 85 a 50, 24 ó 5% en virus muy virulentos, o de 70 a 72,5, 69 ó 72% con virus moderadamente virulentos. Ello ilustra el hecho de que a bajas dosis de contraprueba las vacunas

pueden proteger y que sin embargo a altas dosis la protección no es suficiente. Vacunas como las mencionadas pueden no obstante ser suficientes en campo, debido a que, muy rara vez, pueden observarse epizootías en las que haya concentraciones de virus en el agua de las granjas mayores de 100000 DICT50/ml (Leong *et al.*, 1995). No obstante, todas estas consideraciones deben de tenerse en cuenta al experimentar en el laboratorio.

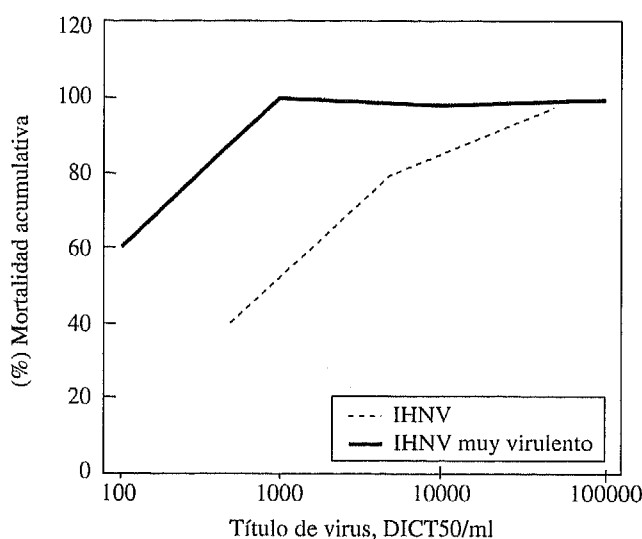


Fig. 5.—Título de virus para contraprueba de animales inmunizados. La contraprueba se debe hacer con varias concentraciones de virus para utilizar una dosis LD50 (la dosis que matará 50% de los peces). Para IHNV y truchas de 0,4-1g los niveles de virus a utilizar están entre 100-10000 DICT50/ml (dosis infectivas de cultivo de tejidos). Datos de Enzman y Konrad (Enzmann y Konrad, 1993).

Title of virus for challenging immunized animals. The challenge should be done with several viral concentrations to use a dosage LD50 (the dosage that will kill 50% of the fish). For IHNV and trout of 0.4-1g the level of the virus to use is between 100-10000 DICT50/ml (infective dosages in tissue culture). Data Enzman and Konrad (Enzman and Konrad, 1993).

SUMMARY

Variables in DNA vaccination in the model trout-rhabdovirus

In this work we review the data for optimal DNA vaccination in the model trout/rhabdovirus. We study the optimal size for vaccination, the design of DNA plasmids, the design of the vaccination methods and the representative conditions of the challenge. The trout/rhabdovirus model has been chosen because the actual economic impact that the rhabdovirus have in the intensive Aquaculture at world wide level not only of salmonids but also of other species. After several years of studies and even though we have not yet any means to control rhabdovirus, the recent development of DNA vaccination makes this technology open a new hope for the possible control of these diseases (Fernández-Alonso *et al.*, 1998).

KEY WORDS: DNA vaccination
Trout/Rhabdovirus

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ANDERSON E.D., MOURICH D.V., FAHRENKRUG S.C., LAPATRA S.C., SHEPHERD J., LEONG J.C., 1996. Genetic immunization of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against infectious hematopoietic necrosis virus. *Molecular Marine Biology Biotechnology* 5, 114-122.
- ANDERSON E.D., MOURICH D.V., LEONG J.C., 1996. Gene expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following intramuscular injection of DNA. *Molecular Marine Biology Biotechnology* 5, 105-113.
- ARCHIBALD D.D., MANN S., 1994. Self assembled microstructures from 1,2, ethanediol suspensions of pure and binary mixtures of neutral and acidic biological galactosylceramides. *Chemical Physics Lipids* 69, 51-64.
- BARRY M.A., LAI W.C., JOHNSON S.A., 1995. Protection against mycoplasma infection using expression-library immunization. *Nature* 377, 632-635.
- BETANCOURT O.H., ATTAL J., THERON M.C., PUISSANT C., HOUEBINE L.M., 1993. Efficiency of introns from various origins in fish cells. *Molecular Marine Biology Biotechnology* 2, 181-188.
- CASTILLO A., SANCHEZ C., DOMINGUEZ J., KAATARI S.L., VILLENA A.J., 1993. Ontogeny of IgM and IgM-bearing cells in rainbow trout. *Dev.Comp.Immunol.* 17, 419-424.
- CUTRIN J.M., CONCHAS R.F., BARJA J.L., TORANZO A.E., 1994. Electroporation of *Yersinia ruckeri* by plasmid DNA. *Microbiologia seminarios* 10, 69-82.
- DAVIDSON G.A., ELLIS A.E., SECOMBES C.J., 1994. A preliminary investigation into the phenomenon of oral tolerance in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*, Walbaum, 19729. *Fish Shellfish Immunology* 4, 141-151.
- DAVIS H.L., MILLAN C.L., MANCINI M., MCCLUSKIE M.J., HADCHOVEL M., COMANITA L., TIOLLAIS P., WHALLEN R.G., MICNEL M.L., 1997. DNA-based immunization against hepatitis B surface antigen (HBsAg) in normal and HBsAg transgenic mice. *Vaccine* 15, 849-852.
- ELLIS A. E., 1988. Ontogeny of the immune system in teleost fish. *Fish vaccination ed.A.E.Ellis*, Academic Press, 20-31.
- ENGELKING H.M., HARRY J.B., LEONG J.C., 1991. Comparison of representative strains of infectious hematopoietic necrosis virus by serological neutralization and cross-protection assays. *Appl.Environ.Microbiol.* 57, 1372-1378.
- ENZMANN H., KONRAD M., 1993. Longevity of antibodies in brown trout and rainbow trout following experimental infection with VHS virus. *Bulleting European Association Fish Pathology* 13, 193-194.
- ESTEPA A., ALVAREZ F., EZQUERRA A., COLL J.M., 1998. Viral-antigen dependence and T-cell receptor expression in leucocytes from rhabdovirus immunized trout. An in vitro model to study fish anti-viral responses. *J.Gen.Virol.* submitted.
- ESTEPA A., ALVAREZ F., VILLENA A., COLL J.M., 1996. Morphology of antigen-dependent haematopoietic cells from trout surviving rhabdoviral infections. *Bull.Eur.Ass.Fish Pathol.* 16, 203-207.
- 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., 1991. Infection of mitogen stimulated colonies from trout kidney cell cultures with salmonid viruses. *J.Fish Dis.* 14, 555-562.
- ESTEPA A., THIRY M., COLL J.M., 1994. Recombinant protein fragments from haemorrhagic septicaemia rhabdovirus stimulate trout leucocyte anamnestic in vitro responses. *J.Gen.Virol.* 75, 1329-1338.
- FERNANDEZ-ALONSO M., ALVAREZ F., ESTEPA A., COLL J.M., 1998. Vacunas DNA en Acuicultura. *AquaTIC* 4, http://aquatic.unizar.es/N1/art401/DNA_vac.htm.
- GAUVRY L., ENNION S., HANSEN E., BUTTERWORTH P., GOLDSPIK G., 1996. Cloning and characterization of a carp myosin heavy chain gene promoter region. *European Journal Biochemistry*.
- GOMEZ-CHIARRI M., LIVINGSTON S.K., MURO-CACHO C., SANDERS S., LEVINE R.P., 1996. Introduction of foreign genes into the tissue of live fish by direct injection and particle bombardment. *Dis.Aquatic Organ.* 27, 5-12.
- GRACE M.F., MANNING M.J., 1980. Histogenesis of the lymphoid organs in rainbow trout, *salmo gairdneri*. *Dev.Comp.Immunol.* 4, 255-264.
- GREGORIADIS G., SAFFIE R., BRIAN DE SOUZA J., 1997. Liposome-mediated DNA vaccination. *FEBS Lett.* 402, 107-110.
- HANSEN E., FERNANDES K., GOLDSPIK G., BUTERWORTH P., UMEDA P.K., CHANG K.-C., 1991. Strong expression of foreign genes following direct injection into fish muscle. *FEBS Lett.* 290, 73-76.
- HEPPELL J., LORENZEN N., ARMSTRONG N.K., WU T., LORENZEN E., EINER-JENSEN K., AHRENS P., SCHORR J., DAVIS H.L., 1998. Development of DNA vaccines for fish: vector design, intramuscular injection and antigen expression using viral haemorrhagic septicaemia virus genes as model. *Fish Shellfish Immunology* (en prensa).

- HORNE M.T., TATNER M., MCDERMONT S., AGIUS C., WARD P., 1982. Vaccination of rainbow trout, *salmo gairdneri* Richardson, at low temperatures and the long persistence of protection. *J.Fish Dis.* 5, 343-345.
- HUANG L., LI S., 1997. Liposomal gene delivery: a complex package. *Nature Biotechnology* 15, 620-621.
- JOHNSON K.A., FLYNN J.K., AMEND D.F., 1982. Duration of immunity in salmonids vaccinated by direct immersion with *Yersinia ruckeri* and *Vibrio anguillarum* bacterins. *Journal of Fish Diseases* 5, 207-212.
- JOHNSON K.A., FLYNN J.K., AMENE, D.F., 1982. Onset of immunity in salmonid fry vaccinated by direct immersion in *Vibrio anguillarum* and *Yersinia ruckeri* bacterins. *J.Fish Dis.* 5, 197-205.
- JONES D.H., CORRIS S., MCDONALD S., CLEGG J.C.S., FARRAR G.H., 1997. Poly (DL-lactide-co-glycolide)-encapsulated plasmid DNA elicits systemic and mucosal antibody responses to encoded protein after oral administration. *Vaccine* 15, 814-817.
- KLAVINKIS L.S., GAO L., BARNFIELD C., LEHNER T., PARKER S., 1997. Mucosal immunization with DNA-liposome complexes. *Vaccine* 15, 818-820.
- KRIEG A.M., YI A.K., MATSON S., WALDSCHMIDT T.J., BISHOP G.A., TEASDALE R., KORETZKY G.A., KLINMAN D.M., 1995. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 374, 546-549.
- LAVELLE E.C., JENKINS P.G., HARRIS J.E., 1997. oral immunization of rainbow trout with antigen microencapsulated in poly(DL-lactide-co-glycolide) microparticles. *Vaccine* 15, 1070-1078.
- LEONG J.C., BOOTLAND L., ANDERSON E., CHIOU P.W., DROLET B., KIM C., LORZ H., MOURICH D., ORMONDE P., PEREZ L., TROBRIDGE G., 1995. Viral vaccines for aquaculture. *Journal Marine Biotechnology* 3, 16-23.
- LEONG K., RAMSAY A.J., BOYLE D.B., RAMSHAW I.A., 1994. Selective induction of immune responses by cytokines coexpressed in recombinant fowlpox virus. *J.Virol.* 68, 8125-8130.
- LORENZO G., ESTEPA A., CHILMONCZYK S., COLL J.M. (1995a). Mapping of the G and N regions of viral haemorrhagic septicemia virus (VHSV) inducing lymphoproliferation by pepscan. *Veterinary Research* 26, 521-525.
- LORENZO G., ESTEPA A., COLL, J.M., 1996. Fast neutralization/immunoperoxidase assay for viral haemorrhagic septicemia with anti-nucleoprotein monoclonal antibody. *J.Virol.Methods* 58, 1-6.
- LORENZO G.A., ESTEPA A., CHILMONCZYK S., COLL J.M., 1995b. Different peptides from haemorrhagic septicemia rhabdoviral proteins stimulate leucocyte proliferation with individual fish variation. *Virology* 212, 348-355.
- MANNING M.J., GRACE M.F., SECOMBES C.J., 1982. Ontogenic aspects of tolerance and immunity in carp and rainbow trout: studies on the role of the thymus. *Dev.Comp.Immunol.* 2, 75-82.
- MAULEN N.P., MORALES P.J., ARUTI D., FIGUEROA J.E., CONCHA M.I., KRAUSKOPF M., LEON G., 1996. Identification of a *Renibacterium salmoninarum* DNA fragment associated with bacterial internalization into CHSE-cultured cells. *FEMS Microbiology letters* 135, 37-43.
- MULLER M., BREM G., 1996. Intracellular, genetic or congenital immunization-transgenic approaches to increase disease resistance of farm animals. *Journal Biotechnology* 44, 233-242.
- NOONAN B., ENZMANN P.J., TRUST T.J., 1995. Recombinant infectious necrosis virus and viral hemorrhagic septicemia virus glycoprotein epitopes expressed in *Aeromonas salmonicida* induce protective immunity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Appl.Environ.Microbiol.* 61, 3586-3591.
- OLESEN N.J., KORSHOLM H., 1997. Control measures for viral diseases in Aquaculture: eradication of VHS and IHN. *Bull.Eur.Ass.Fish Pathol.* 17, 229-233.
- RAZ E., WATANABE A., BAIRD S.M., EISENBERG R.A., PARR T.B., LOTZ M., KIPPS T.J., CARSON D.A., 1993. Systemic immunological effects of cytokine genes injected into skeletal muscle. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 90, 4523-4527.
- SANCHEZ C., COLL J.M., DOMINGUEZ J., 1991. One step purification of rainbow trout immunoglobulin. *Vet.Immunol.Immunopathol.* 27, 383-392.
- SANZ F., COLL J.M., 1992A. Detection of viral haemorrhagic septicemia virus by direct immunoperoxidase with selected anti-nucleoprotein monoclonal antibody. *Bull.Eur.Ass.Fish Pathol.* 12, 116-119.
- SANZ F.A., COLL, J.M., 1992B. 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. *Am.J.Vet.Res.* 53, 897-903.
- SATO Y., ROMAN M., TIGHE H., LEE D., CORR M., NGUYEN M.D., SILVERMAN G.J., LOTZ M., CARSON D.A., RAZ E., 1996. Immunostimulatory DNA sequences necessary for effective intradermal gene immunization. *Science* 273, 352-354.
- SCHINS V.E.C.J., CLAASSEN I.J.T.M., VERMEULEN A.A., HORZINEK M.C., OSTERHAUS A.D.M.E., 1994. Modulation of antiviral immune responses by exogenous cytokines: effects of tumour necrosis factor, interleukin-2 and interferon- γ on the immunogenicity of an inactivated rabies vaccine. *J.Gen.Virol.* 75, 55-63.
- SIZEMORE D.R., BRANSTROM A.A., SADOFF J.C., 1995. Attenuated Shigella as a DNA delivery vehicle for DNA-mediated Immunization. *Science* 270, 299-302.

- TATNER M.F., 1985. The migration of labelled thymocytes to the peripheral lymphoid organs in the rainbow trout, *salmo gairdneri*, Richardson. *Dev.Comp.Immunol.* 9, 85-91.
- TATNER M.F., 1986. The ontogeny of humoral immunity in rainbow trout, *salmo gairdneri*. *Vet.Immunol.Immunopathol.* 12, 93-105.
- TATNER M.F., HORNE M.T., 1984. The effects of early exposure to *vibrio anguillarum* in post-hatching rainbow trout fry, *salmo gairdneri*, Richardson. *Aquaculture* 41, 193-202.
- TATNER M.F., MANNING M.J., 1983. Growth of the lymphoid organs in rainbow trout, *salmo gairdneri*, from one to 15 months of age. *Journal Zoology London* 199, 503-520.
- TATNER M.F., MANNING M.J., 1985. The ontogenetic development of the reticulo endothelial system in rainbow trout, *salmo gairdneri*, Richardson. *J.Fish Dis.* 8, 35-41.
- TEMPLETON N.S., LASIC D.D., FREDERICK P.M., STREY H.H., ROBERTS D.D., PAVLAKIS, G., 1997. Improved DNA:liposome complexes for increased systemic delivery and gene expression. *Nature Biotechnology* 15, 647-652.
- ULMER J.B., DECK R.R., DE WITT C.M., DONNELLY J.J., LIU M.A., 1996. Generation of MHC class-I restricted T lymphocytes by expression of a viral protein in muscle cells: antigen presentation by non-muscle cells. *Immunology* 89, 59-67.
- XIANG Z., ERTL C.J., 1995. Manipulation of the immune response to a plasmid encoded viral antigen by coinoculation with plasmids expressing cytokines. *Cell* 2, 129-135.
- XIANG Z.Q., HE Z., WANG Y., ERTL C.J., 1997. The effect of interferon-gamma on genetic immunization. *Vaccine* 15, 896-898.
- ZAPATA A.G., 1996. Cells and tissues of the immune system of fish. The fish immune system: organism, pathogen, and environment. ed Akira Chivá. Alberto Varas, 278.
- ZAPATA A.G., TORROBA M., ALVAREZ F., ANDERSON D.P., DIXON O.W., WISNIEWSKI M., 1987. Electron microscopic examination of antigen uptake by salmonid gill cells after bath immunization with a bacterin. *J.fish Biology* 31, 209-217.