

REGIONES ESTIMULADORAS DE LINFOPROLIFERACION DEL RABDOVIRUS DE LA SEPTICEMIA HEMORRAGICA DE SALMONIDOS MAPEADAS POR PEPSCAN

G. LORENZO

A. ESTEPA

J. M. COLL

CISA-Valdeolmos. 28130 Madrid, España

S. CHILMONCZYK

INRA, Jouy-en-Josas. París, Francia

RESUMEN

Las regiones estimuladoras de la linfoproliferación de la nucleoproteína N y de la glicoproteína G del virus de la septicemia hemorrágica vírica (VSHV) se han mapeado mediante ensayos de proliferación/pepscan in vitro de leucocitos procedentes de truchas supervivientes a la infección con VSHV (respuestas anamnésicas o de memoria) y truchas resistentes seleccionadas genéticamente (respuestas genéticas o heredadas). Aunque las respuestas linfoproliferativas variaban individualmente de trucha a trucha, las respuestas eran más altas en los cultivos de leucocitos obtenidos de truchas supervivientes a la infección con VSHV que en los de las truchas genéticamente resistentes al VSHV. Los fragmentos recombinantes de ambas proteínas virales manifestaron una estimulación mayor de la linfoproliferación que la de los péptidos sintéticos. El uso de péptidos virales en vez del virus entero o las proteínas virales aisladas podrían ser una herramienta complementaria al estudio de la inmunología viral de los peces.

PALABRAS CLAVE: Linfoproliferación

Pepsan

Rabdovirus

Septicemia hemorrágica

Salmónidos

INTRODUCCION

Los salmónidos poseen uno de los más primitivos sistemas inmunológicos adaptativos. Su sistema inmune parece tener, células B (Kaattari *et al.*, 1986), células T (Partula *et al.*, 1994), células presentadoras de antígeno (Vallejo *et al.*, 1991), células citotóxicas restringidas por histocompatibilidad (Verlhac *et al.*, 1990), grupos de histocompatibilidad no caracterizados (Stet, Egberts, 1991) y una sola clase mayoritaria de inmunoglobulinas semejantes a las IgM (Sánchez *et al.*, 1989). Sus respuestas linfoproliferativas anamnésicas contra agentes como los rabdovirus causantes de grandes mortalidades (Estepa *et al.*, 1991; Estepa, Coll, 1992a) son poco conocidas. Las respuestas de linfocitos T (ensayables por linfo-

Recibido: 28-9-94

Aceptado para su publicación: 24-2-95

proliferación) de los mamíferos a los virus que los infectan están dirigidas a regiones limitadas (inmunodominantes) de ciertas proteínas víricas (Kontseikova *et al.*, 1992). Ahora bien, se desconoce si existen o no regiones víricas similares en las respuestas inmunológicas de los peces (Ellis, 1988).

La falta de una vacuna contra los rhabdovirus de salmónidos hacen de éstos la causa de uno de los mayores daños para la industria internacional de salmicultura. Ello hace necesario el diseño de una vacuna contra el VHSV obtenida bien por métodos de manipulación genética (Lorenzen *et al.*, 1993; Estepa *et al.*, 1994) o bien por péptidos sintéticos (Leong, Fryer, 1993). Ahora bien, la mayoría de los esfuerzos para obtener inmunización contra los patógenos de peces han tenido éxitos muy limitados a pesar de que en algunos casos se ha logrado estimular la producción de anticuerpos neutralizantes (Ellis, 1988). Además, la presencia de anticuerpos no siempre se correlaciona con una inmunidad protectora, con la excepción de las vacunas contra dos enfermedades bacterianas, la boca roja (*Yersinia* sp) (Johnson *et al.*, 1982) y la vibriosis (*Vibrio* sp) (Ellis, 1988).

En el caso de las infecciones por VHSV existen datos que sugieren igualmente que la respuesta de anticuerpos no es suficiente. Por ejemplo: a) solamente el 54 p. 100 de las truchas supervivientes a una infección por VHSV tenían niveles detectables de anticuerpos neutralizantes (Olesen *et al.*, 1991); b) aunque la mayoría de los supervivientes a una primera infección sobreviven una segunda (Basurco, Coll, 1992) no se obtienen respuestas más altas de anticuerpos (Olesen *et al.*, 1991); c) la inmunización de truchas con proteínas virales recombinantes en *E. coli* ha fallado (Estepa *et al.*, 1994; Lorenzen *et al.*, 1993) a pesar de que se han conseguido inducir anticuerpos neutralizantes (Lorenzen *et al.*, 1993). Todos estos datos nos sugirieron el empleo de la respuesta linfoproliferativa para el estudio de la respuesta viral en la trucha como por ejemplo, la linfoproliferación, que además de ser una estimación de proliferación de los linfocitos T es un primer paso a otras posibles respuestas inmunológicas (por ejemplo, la producción de interferón) (Rogel-Gaillard *et al.*, 1993).

Para hacer estos estudios se escogieron tanto la glicoproteína G, como la nucleoproteína N del VHSV, por las razones que se discuten a continuación. Los anticuerpos que neutralizan el VHSV y el VNHI, muestran especificidad por la glicoproteína G (Bernard *et al.*, 1983; Engelking, Leong, 1989; Gilmore *et al.*, 1988; Olesen *et al.*, 1991; Xu *et al.*, 1991) y la glicoproteína G estimuló la linfoproliferación tanto en cultivos de leucocitos de truchas inmunizadas con VHSV (Estepa *et al.*, 1991) como en truchas supervivientes a la infección con VHSV (Estepa, Coll, 1992a; Estepa *et al.*, 1994). Además, las nucleoproteínas N/Nx (Basurco *et al.*, 1991) tuvieron también un efecto estimulador *in vitro* en truchas inmunizadas con VHSV (Estepa *et al.*, 1991) y en truchas supervivientes a la infección por VHSV (Estepa, Coll, 1992a). Resultados similares se han demostrado *in vivo* para el virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (VNHI), otro rhabdovirus de peces (Oberge *et al.*, 1991), en rabia (Ertl *et al.*, 1989) y en otros virus (Ou *et al.*, 1992). Por otra parte, la nucleoproteína N de la rabia se comporta como un superantígeno en humanos (Lafon, 1993; Lafon *et al.*, 1992).

Las respuestas anamnésicas de linfoproliferación celular *in vitro* en la trucha se han estudiado usando VHSV purificado (Chilmonczyk, 1978), proteínas purificadas obtenidas de VHSV y proteínas recombinantes obtenidas en varios vectores (Estepa *et al.*, 1994), pero no se han utilizado hasta ahora péptidos pequeños. En este trabajo se estudian las posibles regiones linfoproliferativas inmunodominantes de la glicoproteína G y de la nucleoproteína N del VHSV utilizando péptidos sintéticos y leucocitos procedentes tanto de truchas supervivientes a la infección con

VSHV como de truchas genéticamente resistentes al VSHV. Se muestran también algunos resultados preliminares obtenidos con fragmentos recombinantes diseñados conforme a las regiones inmunodominantes definidas mediante el uso de los péptidos sintéticos.

MATERIAL Y METODOS

Virus.—El VSHV utilizado fue el VSHV 07.71 aislado en Francia (Bernard *et al.*, 1983; Le Berre *et al.*, 1977) de trucha arco iris, *Onchorynchus mykiss* (Walbaum). El virus se cultivó en la línea celular EPC (Epithelium Papillosum ciprini) y fue purificado por ultracentrifugación en gradiente de sacarosa (Basurco *et al.*, 1991). El análisis de la banda de sedimentación que contenía el 99 p. 100 de la infectividad viral por electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) demostró que un 98 p. 100 de sus proteínas eran las proteínas virales L, G, N, M1 y M2. Esta fracción por microscopía electrónica mostró las partículas típicas de los rhabdovirus. Las nucleoproteínas N y Nx se purificaron a partir del VSHV purificado por PAGE preparativo y electroelución (Basurco *et al.*, 1991).

Péptidos del VSHV (pepscan).—Los péptidos se eligieron de modo que se pudieran presentar por las hipotéticas moléculas de histocompatibilidad de la trucha. Por lo tanto, una serie de péptidos con una longitud de 15 aminoácidos (Chicz *et al.*, 1992) con cinco aminoácidos solapantes y cubriendo la totalidad de las secuencias de la glicoproteína G (Thiry *et al.*, 1991) y de la nucleoproteína N del VSHV-07.71 (Bernard *et al.*, 1990) se sintetizaron químicamente (Chiron Mimotopes, Victoria, Australia). A cada uno de los péptidos se le denominó por la posición aminoterminal del aminoácido intermedio en la secuencia de la proteína (el aminoácido en la posición número 8). El primer péptido de la nucleoproteína N fue el número 9 por necesidades de síntesis. El primer péptido de la glicoproteína G fue el 23 para eliminar la mayor parte del péptido señal, ya que dicho péptido se elimina durante la maduración de la glicoproteína. Los péptidos sintéticos se diluyeron en 5 mM Hepes (pH 7), y 10 µl se pipetearon en cada pocillo de una placa de 96 pocillos (1-4 µM concentración final).

Proteínas recombinantes del VSHV.—N2 y N3 se clonaron y expresaron como se describió (Bernard *et al.*, 1990). N3 se expresó en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* DC04. Los fragmentos recombinantes de la glicoproteína G se clonaron y expresaron como se describió (Koener *et al.*, 1987; Thiry *et al.*, 1991; Estepa *et al.*, 1994). G3 y G4 se expresaron en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* DC04. G25 y G34 se expresaron en la cepa 09 de *Yersinia ruckeri*, un patógeno bacteriano de la trucha (Ellis, 1988). G25 se expresó en forma de proteína de fusión con la proteína estructural antralinato sintetasa (TrpE) y el fragmento G34 se expresó en forma de proteína de fusión con el péptido señal de una lipoproteína de *E. coli*. La caracterización de los extractos de la proteína recombinante se realizó por inmunoprecipitación y ELISA utilizando anticuerpos monoclonales anti-N (Sanz, Coll, 1992).

Producción de truchas supervivientes a la infección.—Alrededor de 400 truchas con un peso entre 0,5 y 2 g se infectaron durante 2 horas a 14-16 °C con 10⁵ DICT/ml sobre la línea celular EPC (Basurco, Coll, 1992). En estas condiciones y después de un mes, la supervivencia de las truchas estaba entre un 10-30 p. 100 (n = 4, n = número de experimentos diferentes). Las truchas supervivientes a esta primera infección, se contraprobaron 1-3 meses después con virus aislado de trucha infectada y con un solo pase de cultivo en EPC (10⁶ DICT /ml, 2 h,

10-11 °C). Después de un mes, alrededor del 50-80 p. 100 ($n = 4$) de las truchas sobrevivieron a la segunda infección, no mostraron signos de SHV y se utilizaron 2-4 meses después de la última infección (50-100 g por trucha) (Enzmann, Konrad, 1993). Las truchas control no infectadas se mantuvieron en acuarios paralelos.

Truchas genéticamente resistentes al VSHV.—Las truchas resistentes al VSHV (unos 200 g de peso cada una) se obtuvieron en el INRA (Jouy-en-Josas, Francia) mediante un programa de selección genética que comenzó en 1984 (Dorson, Torch, 1993). Los descendientes de varias truchas machos se seleccionaron por su resistencia a una infección por VSHV. Hermanos de las truchas naturalmente resistentes al VSHV se criaron durante cuatro generaciones seleccionando las poblaciones hermanas de las truchas resistentes al VSHV. Las truchas utilizadas en los experimentos descritos pertenecían a una población 95 p. 100 resistente al VSHV pero no resistentes a infecciones causadas por el VNPI o el VNHI, tal y como se valoró por infección de sus hermanos.

Preparación de leucocitos de riñón de trucha.—Los leucocitos del riñón de trucha (equivalente a la médula ósea en mamíferos), se obtuvieron (Estepa, Coll, 1992a; Estepa, Coll, 1992b) a partir de truchas individuales para evitar posibles reacciones cruzadas entre los leucocitos de distintos individuos (Stet, Egberts, 1991). La concentración celular y el medio de cultivo celular se seleccionaron para una linfoproliferación óptima (no mostrado). La concentración de leucocitos se determinó con un hemocitómetro y se ajustó a una concentración de células redondeadas y viables de $2,4 \times 10^4$ células/ml. El medio de cultivo celular fue el RPMI-1640 (modificado por Dutch, 290 mOsm/kg) con 2 mM L-glutamina, 1 mM piruvato sódico, 1,2 µg/ml anfotericina, 50 µg/ml gentamicina, 20 mM Hepes, 50 µM β-mercaptoetanol, 10 p. 100 de suero de ternera fetal preensayado y 0,5 p. 100 de un pool de suero de trucha preensayado. Después de preparar la suspensión de leucocitos, se pipetearon 100 µl en cada pocillo de una placa de 96 pocillos (Costar, Holanda) que ya contenía 10 µl de péptidos sintéticos. Las placas se sellaron después en bolsas de plástico de 20 × 12 cm (Vaessen, Schoemaker Indtal S.A., Barcelona, España), se gasearon con 5 p. 100 de CO₂ en aire, se volvieron a sellar y se incubaron a 20 °C durante diez días.

Ensayos de linfoproliferación.—Después de ocho días de cultivo, las placas se pulsaron con 1 µCi de metil-timidina tritiada (60 µCi/mmol, Amersham, Holanda) en 25 µl de medio de cultivo por pocillo (Estepa, 1992; Tatner, 1990). Las células se recolectaron con agua destilada dos días después sobre filtros de fibra de vidrio (Printed Filtermat A, 1450-421) con un Tomtec cell Harvester de 96 pocillos (Tomtec, Orange, Conn., USA). Los filtros se secaron, se introdujeron en bolsas con líquido de centelleo, (Optiphase Hisafe II) y se contaron en un contador de centelleo líquido 1450 Microbeta (Wallac, Oy, Turku, Finlandia & Pharmacia Ibérica S.A.). Para cada trucha, los resultados se obtuvieron como la media de 3-4 placas, la estimulación positiva se obtuvo en cultivos por duplicado (dos por placa) que contenían 2 µg/ml de fitohemaglutinina (PHA, Flow Lab, Ayrshire, UK) y la incorporación de fondo se obtuvo en cultivos sin péptidos por duplicado (dos por placa). El índice de estimulación (IE) se calculó por la fórmula, cuentas por minuto (cpm) incorporadas en presencia del péptido/fondo. Los péptidos inmunodominantes para cada trucha se definieron para un 95 p. 100 de nivel de confianza suponiendo una distribución normal de los valores del IE ($> IE \text{ medio} + 2 \times \text{desviación standard}$).

Análisis de las secuencias de las proteínas N y G.— Los perfiles de hidrofili-
cidad del ADNc derivado de las secuencias de ambas proteínas N y G (Thiry *et al.*, 1991) se obtuvieron con el programa ANTIGEN del PCGene (Intelligenetics Inc, Geneve, Suiza) usando una ventana de nueve aminoácidos. Otras secuencias

rabdovirales (VSV, las cepas New Jersey, Indiana, Orsay, San Juan y Chandipura, Era Rabia y la cepa Cedar del VNHI) se obtuvieron usando el programa PCGene (Intelligenetics, Inc, California, USA) y el banco de datos EMBL-Gen Bank.

RESULTADOS

Linfoproliferación de leucocitos de truchas supervivientes a la infección por VSHV en presencia de virus purificados

Los virus purificados se ensayaron utilizando concentraciones de proteína de 1 a 50 µg/ml y el IE más alto obtenido está representado en la Tabla 1. El IE para los serotipos ensayados del VSHV estaba entre 1,39 y 3,8, en contraste con los IE obtenidos ($IE < 0,76$) para el virus de la necrosis pancreática infecciosa (VNPI), un birnavirus de salmónidos.

Respuestas linfoproliferativas significativas se encontraron también para el virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (VNHI), otro rabdovirus de salmó-

TABLA 1
INDICE DE ESTIMULACION (IE) DE VIRUS DE PECES
EN CULTIVOS DE LEUCOCITOS DE TRUCHAS
SUPERVIVIENTES A LA INFECCION POR VSHV

Stimulation index (SI) of different fish virus in leucocytes
cultures from survivors of VHSV infection trout

Virus	µg/ml	TA	TB
VSHV-F1	12	1,57 ± 0,07 (4,4)	2,16 ± 0,13 (6)
VSHV-F2	15	2,1 ± 0,05 (2,3)	1,32 ± 0,25 (15,9)
VSHV-23.75	22	2,22 ± 0,09 (4,0)	3,28 ± 0,17 (5,1)
VSHV-07.71	10	1,39 ± 0,19 (13,6)	3,8 ± 0,30 (7,8)
PNV-SP	43	0,76 ± 0,18 (13,1)	0,15 ± 0,01 (6,6)
IHNV	17	1,89 ± 0,39 (20,0)	4,41 ± 0,04 (0,09)

Cada virus (los tres serotipos de referencia F1, F2, 23.75 y 07.71) se concentraron y purificaron por ultracentrifugación (Basurco, 1990; Basurco, Coll, 1992). El IPNV purificado fue donado por el Dr. R. Hedrick, Davis, California. Los virus se añadieron a las placas de 96 pocillos a diferentes concentraciones y después se inactivaron por calor a 50 °C durante una hora. Las concentraciones víricas (1 a 50 mg proteína viral/ml) que dan el índice de estimulación (IE) más alto se muestran en la tabla.

Los resultados se dan en medias ± desviación standard de los duplicados

El fondo fue de 630 ± 50 cpm. El coeficiente de variación CV se da en porcentajes entre paréntesis

TA, trucha A; TB, trucha B. IPNV, virus de la necrosis pancreática infecciosa. IHNV, rabdovirus de la necrosis hematopoyética infecciosa

Each VHSV (the 3 reference serotypes F1, F2, 23.75 y 07.71) was concentrated and purified by ultracentrifugation as reported before (Basurco, Coll, 1992). Purified IPNV was a gift of Dr. R. Hedrick, Davis, California. Viruses were added to 96-well plates at different concentrations and then inactivated by heating the plates to 50 °C during 1 h. The viral concentrations (1 to 50 Mg viral protein/ml) giving the highest stimulation index (SI) are shown in the table. Backgrounds were 630 ± 50 cpm

The results are given in mean ± standard deviation from duplicates

The coefficient of variation CV, is given in percentages in parenthesis

TA, trout number A; TB, trout number B. IPNV, infectious pancreatic necrosis virus. IHNV, infectious hematopoyetic necrosis virus

nidos. El coeficiente de variación de las desviaciones standard obtenido fue entre 0,9 a 20 p. 100.

Linfoproliferación de leucocitos de truchas supervivientes a la infección por VSHV en presencia de péptidos de la nucleoproteína N

Los péptidos inmunodominantes fueron los péptidos 9, 109, 119 y 129 para la trucha 1; 39, 59, 169 y 299 para la trucha 2; 49 para la trucha 3; 49, 229 y 289 para la trucha 4, y 49, 289, 379, 389 y 399 para la trucha 5 (Fig. 1). Cada trucha individual superviviente a la infección por VSHV mostró un perfil diferente de respuestas a los péptidos, sin embargo, el péptido 49 fue inmunodominante en tres de las cinco truchas ensayadas. Algunas truchas mostraron linfoproliferación con un mayor número de péptidos y su IE fue mayor, como las truchas 1 y 4, y otras truchas mostraron una linfoproliferación menor, como la trucha 3. Los IE más altos oscilaron entre 3-4 excepto los de la trucha 1 que fueron más altos que el resto (> 4). La Figura 1 muestra también que la mayor parte de los péptidos de la nucleoproteína N (excepto los péptidos mencionados arriba) no indujeron linfoproliferación. La especificidad de la respuesta se ensayó además en cinco truchas no infectadas y no se hallaron respuestas de proliferación significativas ($IE > 1$) para ninguno de los péptidos (trucha 6).

Linfoproliferación de leucocitos de truchas supervivientes a la infección por VSHV en presencia de péptidos de la glicoproteína G

Los péptidos inmunodominantes fueron, los péptidos 106, 116, 126, 376, 386 y 496 para la trucha 1; 196 y 306 para la trucha 2; 316 y 466 para la trucha 3; 36, 76, 86, 96, 196, 206, 346 y 366 para la trucha 4, y 26 y 366 para la trucha 5. Cada trucha individual superviviente a la infección por VSHV mostró un perfil diferente de respuesta a los péptidos (Fig. 2). Algunas truchas mostraron una linfoproliferación con un mayor número de péptidos y su IE fue generalmente mayor, como las truchas 1 y 4 pero otras truchas mostraron una linfoproliferación menor, como las truchas 2 y 3. El IE más alto fue > 5 , excepto los de la trucha 1 que fueron más altos que el resto (el más alto > 11). La Figura 2 muestra también que la mayoría de los péptidos de la glicoproteína G (excepto los péptidos antes mencionados) no estimularon linfoproliferación de los leucocitos de truchas supervivientes a la infección del VSHV. La especificidad de la respuesta se ensayó además en cinco truchas no infectadas y no se encontraron respuestas linfoproliferativas inmunodominantes para ninguno de los péptidos (Fig. 2, trucha 6).

Linfoproliferación de leucocitos de truchas resistentes al VSHV en presencia de péptidos de la nucleoproteína N

Los péptidos inmunodominantes fueron, los péptidos 49, 219 y 229 para la trucha 7; 39 y 289 para la trucha 8; los péptidos 29, 49, 59, 169 y 289 para la trucha 9; 49 y 169 para la trucha 10; y los péptidos 39, 49 y 169 para la trucha 11 (Fig. 3). Cada trucha individual resistente al VSHV mostró un perfil diferente de respuestas a los péptidos, sin embargo, el péptido 49 era inmunodominante en cuatro de las cinco truchas ensayadas. El nivel más alto de IE osciló de 2 a 3. La Figura 3 muestra además que la mayoría de los péptidos de la nucleoproteína N

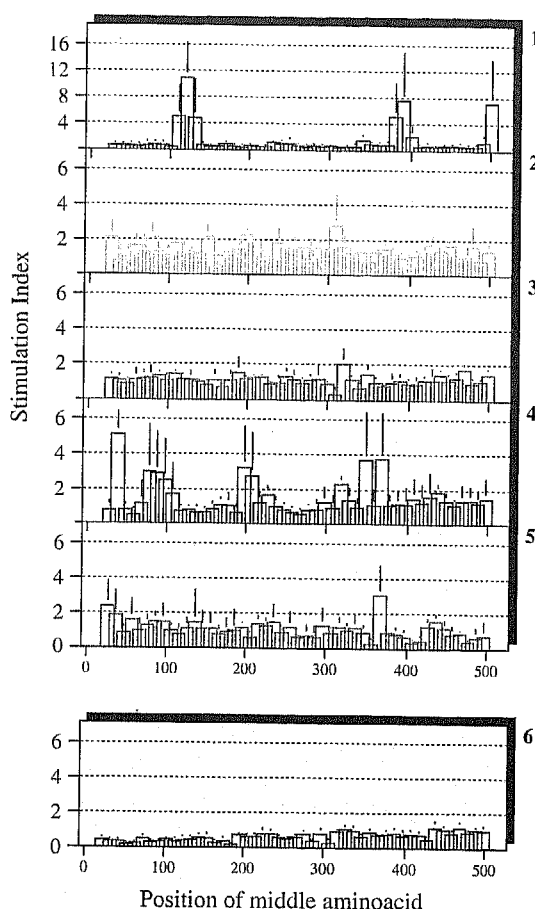


Fig. 1.—IE de leucocitos de truchas supervivientes a la infección por VHSV en presencia de péptidos de la nucleoproteína N
SI of leucocytes from survivors of VHSV infection trout in the present of peptides of the nucleoprotein N

Las barras verticales representan las medias de los tetraplicados $\pm$ desviaciones standar de cinco truchas supervivientes a la infección con VHSV (números 1 al 5). La trucha 6 fue una trucha control no infectada representativa de otras cuatro truchas. Los fondos en cuentas por minuto (cpm) fueron, 260 ± 56 para la trucha 1; 100 ± 20 para la trucha 2; 712 ± 54 para la trucha 3; 190 ± 120 para la trucha 4; 246 ± 75 para la trucha 5 y 250 ± 86 para la trucha 6. Las medias de los IE de todos los péptidos fueron, $0,92 \pm 1,02$ para la trucha 1; $1,03 \pm 0,43$ para la trucha 2; $0,95 \pm 0,24$ para la trucha 3; $1,22 \pm 0,5$ para la trucha 4; $1,05 \pm 0,47$ para la trucha 5 y $0,56 \pm 0,16$ para la trucha 6. Los IE para PHA fueron, $4,9 \pm 1,2$ para la trucha 1; $5,2 \pm 0,6$ para la trucha 2; $7,6 \pm 1$ para la trucha 3; $9,7 \pm 0,5$ para la trucha 4; $7,5 \pm 1,5$ para la trucha 5 y $3,6 \pm 0,2$ para la trucha 6. Vertical bars represent the averages from tetraplicates $\pm$ standar deviations from trout survivors of VHSV infection (number 1 to 5). Trout number 6 out of 5 was a control non infected trout. Backgrounds in counts per min (cpm) were, 260 ± 56 for trout 1; 100 ± 20 for trout 2; 712 ± 54 for trout 3; 190 ± 120 for trout 4; 246 ± 75 for trout 5 and 250 ± 86 for trout 6. The averages of SI of all the peptides were, $0,92 \pm 1,02$ for trout 1; $1,03 \pm 0,43$ for trout 2; $0,95 \pm 0,24$ for trout 3; $1,22 \pm 0,5$ for trout 4; $1,05 \pm 0,47$ for trout 5 and $0,56 \pm 0,16$ for trout 6. SI stimated by PHA were, $4,9 \pm 1,2$ for trout 1; $5,2 \pm 0,6$ for trout 2; $7,6 \pm 1$ for trout 3; $9,7 \pm 0,5$ for trout 4; $7,5 \pm 1,5$ for trout 5 and $3,6 \pm 0,2$ for trout 6

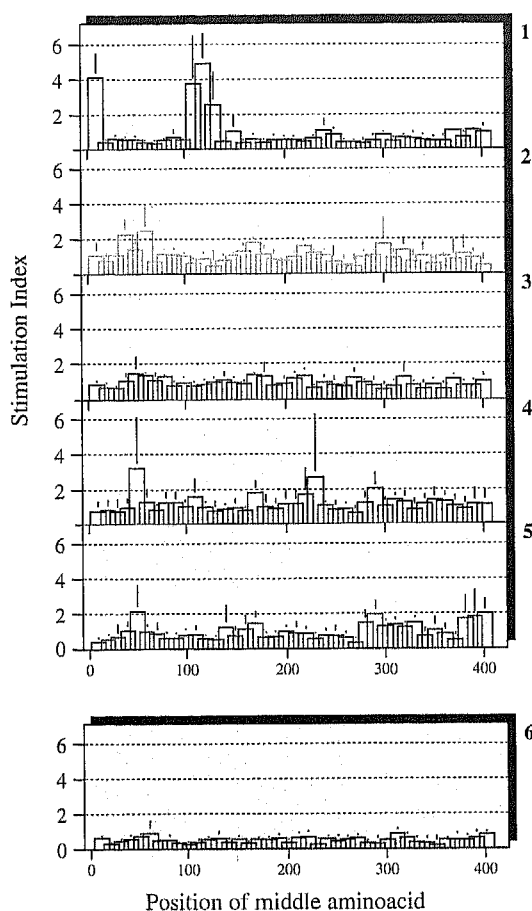


Fig. 2.—IE de leucocitos de truchas supervivientes a la infección por VHSV en presencia de péptidos de la glicoproteína G

SI of leucocytes from survivors of VHSV infection trout in the presence of peptides of the glycoprotein G

Las barras verticales representan las medias por tetraplicado $\pm$ las desviaciones standar de las truchas supervivientes a la infección VHSV (números 1 al 5). La trucha 6 fue una trucha control no infectada representativa de otras cuatro truchas. Los fondos en cuentas por minuto (cpm) fueron, 260 ± 56 para la trucha 1; 100 ± 20 para la trucha 2; 712 ± 54 para la trucha 3; 190 ± 120 para la trucha 4; 246 ± 75 para la trucha 5 y 250 ± 86 para la trucha 6. Las medias IE de todos los péptidos $\pm$ desviación standar para cada trucha fueron, $1,75 \pm 2,7$ para la trucha 1; $1,31 \pm 0,45$ para la trucha 2; $1,08 \pm 0,27$ para la trucha 3; $1,45 \pm 0,93$ para la trucha 4; $1,08 \pm 0,47$ para la trucha 5 y $0,63 \pm 0,28$ para la trucha 6. Los IE para PHA fueron, $4,9 \pm 1,2$ para la trucha 1; $5,2 \pm 0,6$ para la trucha 2; $7,6 \pm 1$ para la trucha 3; $9,7 \pm 0,5$ para la trucha 4; $7,5 \pm 1,5$ para la trucha 5 y $3,6 \pm 0,2$ para la trucha 6.

Vertical bars represent the averages from tetraplicates $\pm$ standar deviations from trout survivors of VHSV infection (number 1 to 5). Trout number 6 out of 5 was a control non infected trout. Backgrounds in counts per min (cpm) were, 260 ± 56 for trout 1; 100 ± 20 for trout 2; 712 ± 54 for trout 3; 190 ± 120 trout 4; 246 ± 75 for trout 5 and 250 ± 86 for trout 6. The averages of SI of all the peptides $\pm$ standar deviations for each trout were, $1,75 \pm 2,7$ for trout 1; $1,31 \pm 0,45$ for trout 2; $1,08 \pm 0,27$ for trout 3; $1,45 \pm 0,93$ for trout 4; $1,08 \pm 0,47$ for trout 5 and $0,63 \pm 0,28$ for trout 6. SI by PHA were, $4,9 \pm 1,2$ for trout 1; $5,2 \pm 0,6$ for trout 2; $7,6 \pm 1$ for trout 3; $9,7 \pm 0,5$ for trout 4; $7,5 \pm 1,5$ for trout 5 and $3,6 \pm 0,2$ for trout 6

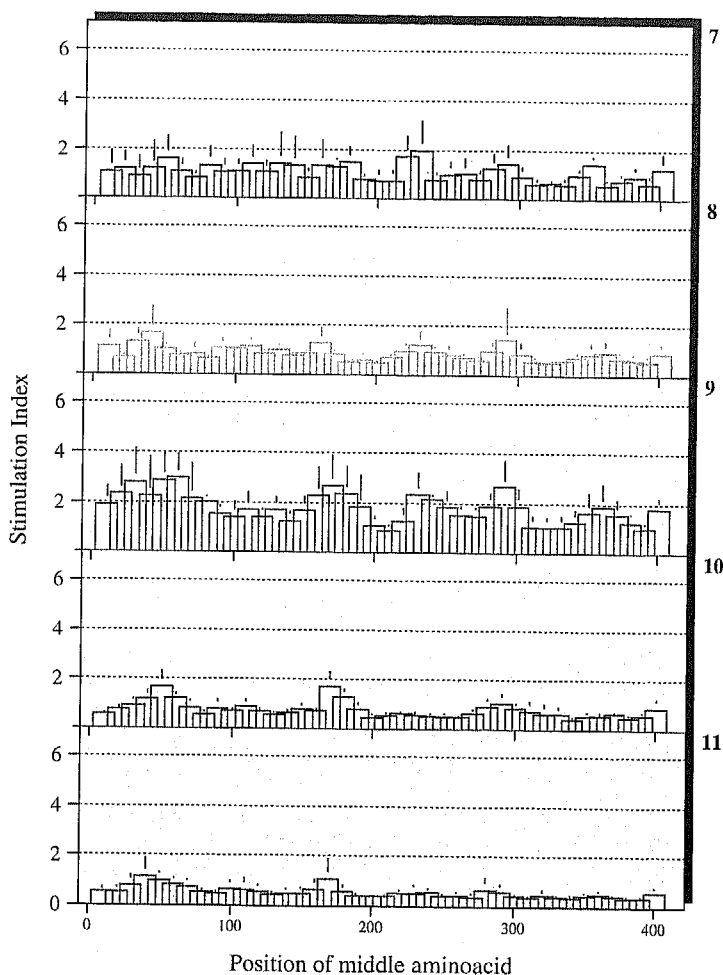


Fig. 3.—IE de leucocitos de truchas resistentes al VHSV en presencia de péptidos de la nucleoproteína N
SI of leucocytes from VHSV resistant trout in the presence of nucleoprotein N peptides

Las barras verticales representan las medias de los triplicados $\pm$ las desviaciones standar de cinco truchas resistentes-VHSV (números 7 al 11). Los fondos en cuentas por minuto fueron, 869 ± 261 para la trucha 7; 650 ± 76 para la trucha 8; 542 ± 94 para la trucha 9; 943 ± 137 para la trucha 10 y 847 ± 125 para la trucha 11. Las medias de los IE de todos los péptidos $\pm$ desviación standar para cada trucha fueron, $1,07 \pm 0,33$ para la trucha 7; $0,83 \pm 0,26$ para la trucha 8; $1,79 \pm 0,55$ para la trucha 9; $0,78 \pm 0,29$ para la trucha 10 y $0,55 \pm 0,18$ para la trucha 11. Los IE para PHA fueron, $6,4 \pm 1,1$ para la trucha 7; $7,2 \pm 0,26$ para la trucha 8; $9,3 \pm 2,2$ para la trucha 9; $8,1 \pm 2,6$ para la trucha 10 y $6,4 \pm 3,4$ para la trucha 11.

Vertical bars represent the averages from triplicates $\pm$ standar deviations from 5 VHSV resistant trout (number 7 to 11). Backgrounds in counts per min (cpm) were, 869 ± 261 for trout 7; 650 ± 76 for trout 8; 542 ± 94 for trout 9; 943 ± 137 for trout 10 and 847 ± 125 for trout 11. The averages of SI of all the peptides $\pm$ standar deviations for each trout were, $1,07 \pm 0,33$ for trout 7; $0,83 \pm 0,26$ for trout 8; $1,79 \pm 0,55$ for trout 9; $0,78 \pm 0,29$ for trout 10 and $0,55 \pm 0,18$ for trout 11. SI by PHA were, $6,4 \pm 1,1$ for trout 7; $7,2 \pm 0,26$ for trout 8; $9,3 \pm 2,2$ for trout 9; $8,1 \pm 2,6$ for trout 10 and $6,4 \pm 3,4$ for trout 11.

(excepto los péptidos mencionados arriba) no indujeron una linfoproliferación significativa.

Linfoproliferación de leucocitos de truchas resistentes al VSHV en presencia de péptidos de la glicoproteína G

Los péptidos inmunodominantes fueron, los péptidos 206, 326 y 346 para la trucha 7; 206 y 326 para la trucha 8; los péptidos 416, 426, 446, 456 y 496 para la trucha 9; los péptidos 66, 116, 126 y 326 para la trucha 10; y los péptidos 56, 66 y 206 para la trucha 11 (Fig. 4). Cada trucha individual resistente al VSHV mostró un perfil diferente de respuesta a los péptidos. Algunas truchas mostraron linfoproliferación con un mayor número de péptidos y su IE fue mayor, como las truchas 9 y 11, pero otras mostraron una linfoproliferación menor, como las truchas 8 y 10. El IE más alto fue < 5 . La Figura 4 muestra también que la mayor parte de los péptidos de la glicoproteína (excepto los antes mencionados) no estimularon linfoproliferación de leucocitos en truchas resistentes al VSHV. Los resultados de los experimentos de pepsan con linfoproliferación > 95 p. 100 de confianza se sumarian en la Figura 5.

Linfoproliferación de leucocitos de truchas supervivientes a la infección del VSHV en presencia de proteínas recombinantes de VSHV

La Tabla 2 muestra que el IE obtenido con la nucleoproteína N obtenida bien por purificación del VSHV o bien por extractos recombinantes de *E. coli*/levadura era más alto en cultivos de leucocitos obtenidos de truchas supervivientes a la infección por el VSHV que en cultivos de leucocitos de las truchas no infectadas. En una de las truchas, fue la proteína Nx la que obtuvo una mayor estimulación de la linfoproliferación (IE de 33 ± 5).

La Tabla 2 también muestra que los IE más altos se obtuvieron para los fragmentos recombinantes de la glicoproteína G4 ($8,3 \pm 4,4$) y G25 ($7,5 \pm 5$), fragmentos que contenían la mayoría de las secuencias de los péptidos sintéticos que mostraban linfoproliferación (Fig. 2). La eliminación de la parte carboxi-terminal de la glicoproteína G, como sucede en G34 resultó en un menor pero aún alto IE ($6,7 \pm 3,2$). Experimentos paralelos con truchas no infectadas mostraron un bajo IE (0,5-1) en todas las proteínas recombinantes ensayadas.

Para comparar la magnitud de los IE obtenidos con los péptidos sintéticos y con fragmentos recombinantes de la glicoproteína G, de la nucleoproteína N y un mitógeno policlonal (fitohemaglutinina, PHA), los experimentos de linfoproliferación se hicieron con leucocitos de las truchas 4 y 5 (experimentos no mostrados). Los IE obtenidos variaron con la cantidad de G4 añadida, siendo el máximo IE de 8. PHA fue el mitógeno más potente ya que solamente 5 $\mu\text{g/ml}$ de PHA comparado con 75 $\mu\text{g/ml}$ de G4 bastaban para obtener las respuestas linfoproliferativas más altas (trucha 4) o comparables (trucha 5).

DISCUSION

Los leucocitos de truchas supervivientes a la infección con VSHV (respuesta anamnésica) son capaces de reconocer y proliferar en presencia de péptidos sinté-

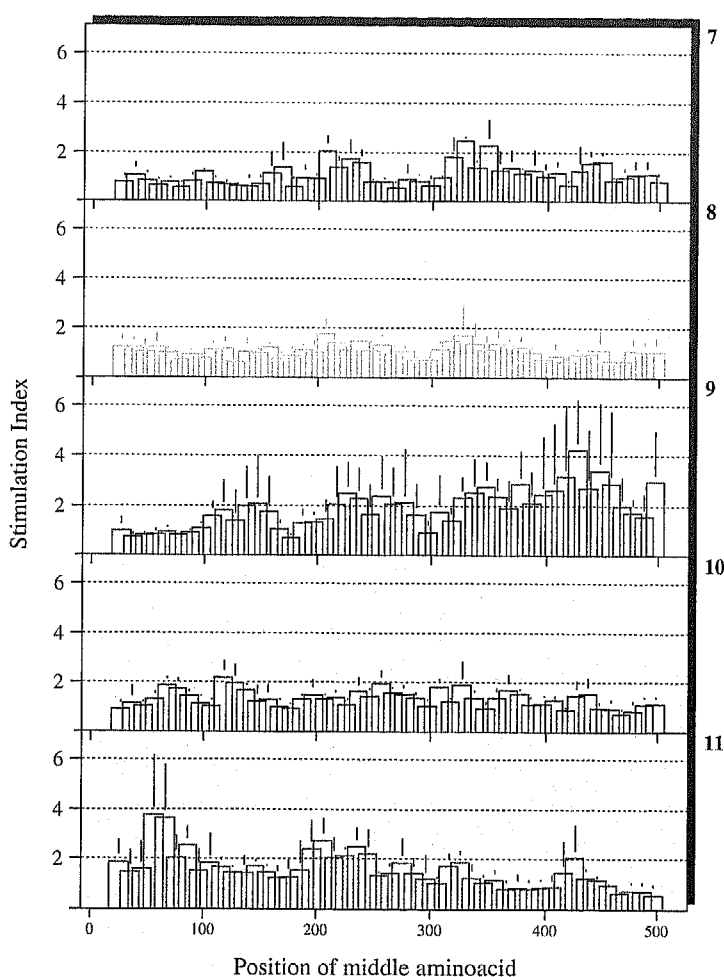


Fig. 4.—IE de leucocitos de truchas resistentes al VHSV en presencia de péptidos de glicoproteína G
SI of leucocytes from VHSV resistant trout in the presence of glycoprotein G peptides

Las barras verticales representan las medias de triplicados $\pm$ desviaciones standar de truchas resistentes al VHSV (números 7 al 11). Los fondos en cuentas por minuto fueron, 869 ± 261 para la trucha 7; 650 ± 76 para la trucha 8; 542 ± 94 para la trucha 9; 943 ± 137 para la trucha 10 y 847 ± 125 para la trucha 11. Las medias de los IE de todos los péptidos $\pm$ desviación standar para cada trucha fueron, $1,09 \pm 0,42$ para la trucha 7; $1,09 \pm 0,25$ para la trucha 8; $1,89 \pm 0,77$ para la trucha 9; $1,37 \pm 0,33$ para la trucha 10 y $1,58 \pm 0,66$ para la trucha 11. Los IE para PHA fueron, $6,4 \pm 1,1$ para la trucha 7; $7,2 \pm 0,26$ para la trucha 8; $9,3 \pm 2,2$ para la trucha 9; $8,1 \pm 2,6$ para la trucha 10 y $6,4 \pm 3,4$ para la trucha 11.

Vertical bars represent the averages from triplicates $\pm$ standar deviations from 5 VHSV resistant trout (number 7 to 11). Backgrounds in counts per min (cpm) were, 869 ± 261 for trout 7; 650 ± 76 for trout 8; 542 ± 94 for trout 9; 943 ± 137 for trout 10 and 847 ± 125 for trout 11. The averages of SI of all de peptides $\pm$ standar deviations for each trout were, $1,09 \pm 0,42$ for trout 7; $1,09 \pm 0,25$ for trout 8; $1,89 \pm 0,77$ for trout 9; $1,37 \pm 0,33$ for trout 10 and $1,58 \pm 0,66$ for trout 11. The SI for PHA were, $6,4 \pm 1,1$ for trout 7; $7,2 \pm 0,26$ for trout 8; $9,3 \pm 2,2$ for trout 9; $8,1 \pm 2,6$ for trout 10 and $6,4 \pm 3,4$ for trout 11.

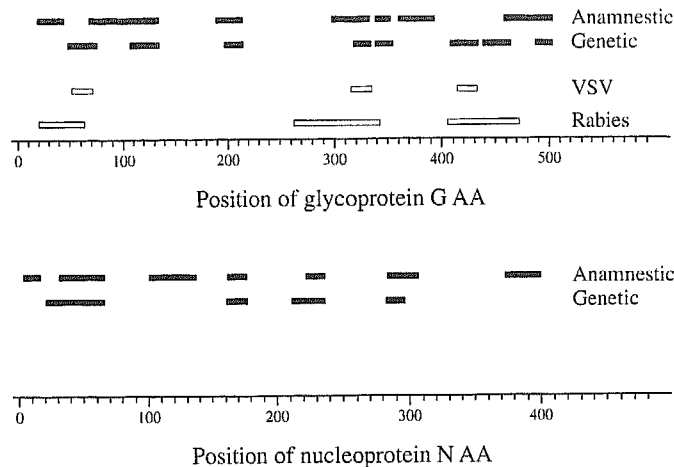


Fig. 5.—Regiones de la glicoproteína G y de la nucleoproteína N que muestra las linfoproliferaciones más altas en las truchas ensayadas
Glycoprotein G and nucleoprotein N regions showing the highest lymphoproliferation in the trout tested

Las regiones definidas por los péptidos que muestran inmunodominancia en al menos una de las truchas testadas (Tabla 2 y 3) se han representado junto a las posiciones de los aa. Respuestas anamnésicas (—), supervivientes a la infección con VHSV), genéticas (—), truchas genéticamente resistentes al VHSV). (—), regiones cortadas de la glicoproteína G de rabia que muestran linfoproliferación en ratones (datos de Mac Farlan, 1984) y epítomos de linfocitos T de VSV en ratones (datos de Burkhart, 1994)
Regions defined by the peptides showing immunodominance in at least one of the trout tested (Table 2 and 3) have been plotted against their aa position for anamnestic responses (—, survivors of VHSV infection), genetic (—, VHSV genetically resistant trout). (—), rabies glycoprotein G regions showing lymphoproliferation in mice (data from Mac Farlan, 1984) and T-helper epitopes of VSV in inbred mice (data from Burkhart, 1994)

ticos solapantes (pepscan) correspondientes a las secuencias de la nucleoproteína N y de la glicoproteína G del virus de la septicemia hemorrágica vírica (VHSV), un fenómeno de inmunodominancia no descrito todavía en trucha. La existencia de inmunodominancia individual en la trucha sugiere que la respuesta inmune viral (supuestamente de linfocitos T) en los peces, podría deberse a interacciones célula-célula similares a las de los vertebrados superiores (Burkhart *et al.*, 1994; Ertl *et al.*, 1989).

Las altas desviaciones estándar encontradas en algunas respuestas a los péptidos estimuladores pueden deberse a la necesidad de utilizar un número de células relativamente bajo por pocillo reflejando una distribución heterogénea de unos pocos precursores entre los pocillos. Sin embargo, existían limitaciones en el número de células por trucha necesarias para ensayar todos los péptidos 3-4 veces. La respuesta linfoproliferativa era específica según se demostró para diferentes virus (Tabla 1) y no existente en truchas no infectadas (Figs. 1 y 2, trucha 6). Algunas truchas mostraron altas respuestas (Figs. 1 y 2, truchas 1 y 4) y otras truchas mostraron bajas respuestas anamnésicas (Figs. 1 y 2, trucha 3). La respuesta frente a cada uno de los péptidos también varió de trucha a trucha. Es probable que al no ser congénicas podrían tener diferentes antígenos de histocompatibilidad

TABLA 2
INDICE DE ESTIMULACION (IE) DE LEUCOCITOS DE TRUCHAS
NO INFECTADAS/SUPERVIVIENTES A LA INFECCION POR VHSV
INDUCIDO POR FRAGMENTOS RECOMBINANTES Y PURIFICADOS
DE LA GLICOPROTEINA G Y DE LA NUCLEOPROTEINA N

Stimulation index (SI) of leucocytes from non-infected/survivors of VHSV infection trout induced by purified and recombinant fragments of glycoprotein G and nucleoprotein N

fragmentos recombinantes	IE (n, truchas)		
	aa	no infectadas	supervivientes al VHSV
G3	1-517	0,5 ± 0,4 (3)	4,0 ± 3,2 (5)
G4	9-443	0,9 ± 0,7 (3)	8,3 ± 4,4 (5)
G25	86-418	0,9 ± 1,0 (2)	7,5 ± 5,0 (3)
G34	86-277	1,0 ± 0,1 (2)	6,7 ± 5,0 (3)
N	1-404	1,9 ± 1,0 (2)	4,2 ± 2,8 (3)
Nx	1-404	1,0 ± 0,1 (2)	12,3 ± 14,6 (3)
N2	1-404	1,3 ± 0,4 (3)	3,1 ± 1,02 (3)
N3	1-404	0,5 ± 0,3 (4)	2,3 ± 0,29 (3)

Cada extracto recombinante se ensayó a varias concentraciones para dar un IE óptimo n = número de truchas diferentes ensayadas cada una por duplicado. G3, G4, N, Nx, N2 y N3, 50 µg/ml y G25 y G34, 250 mg/ml (Estepa *et al.*, 1994). N, proteína N purificada del VHSV por PAGE y electroelución. El alto IE y la desviación standard obtenidos para la proteína Nx en leucocitos de truchas supervivientes al VHSV fue debido a una de las tres truchas ensayadas. Los extractos de proteína no recombinante de levadura, E. coli o Yersinia se añadieron a las mismas concentraciones finales que los extractos de proteína recombinante para estimar la incorporación de timidina tritiada en cultivos control (fondo). Los fondos fueron, 645 ± 240 cpm para el extracto de levadura (G3, G4 y N3); 520 ± 250 cpm para el extracto de E. coli (N2) y 750 ± 315 cpm para el extracto de Yersinia (G25 y G34). IE = cpm en presencia de proteínas recombinantes/fondo. aa, aminoácidos.

*Each recombinant extract was assayed at several concentrations to give an optimal SI, n = number of different trout assayed each by duplicate. G3, G4, N, Nx, N2 y N3, 50 Mg/ml y G25 y G34, 250 Mg/ml (Estepa *et al.*, 1994). N, protein N purified from VHSV by PAGE and electroelution. The high SI and standard deviation of Nx in leucocytes from VHSV survivors was due to the higher data obtained in only 1 of the 3 trout tested. Non recombinant protein extracts from yeast, E. coli or Yersinia were added at the same final protein concentrations than recombinant protein extracts to estimate thymidine incorporation in control cultures (backgrounds). Backgrounds were, 645 ± 240 cpm for yeast (G3, G4 and N3); 520 ± 250 cpm for E. coli (N2) and 750 ± 315 cpm for Yersinia (G25 and G34). SI = cpm in the presence of recombinant proteins/background. aa, aminoacids*

parte, también podrían tener diferente repertorio de regiones variables del receptor de células T (Partula *et al.*, 1994). Aunque la magnitud de las respuestas a los péptidos fue generalmente más baja que a los fragmentos recombinantes de la glicoproteína G o a la nucleoproteína N expresadas en bacterias y/o levadura (Tabla 2), en algunas truchas (por ejemplo la trucha 1), la respuesta anamnésica a péptidos es incluso mayor que la linfoproliferación inducida por PHA, lo que parece indicar que al menos en algunas truchas, la frecuencia de precursores inducida por la infección es elevada, lo que podría explicarse bien por un cambio de repertorio del receptor de linfocitos T, o por la expresión de antígenos específicos de histocompatibilidad.

El IE fue mayor en cultivos de leucocitos obtenidos en truchas supervivientes a la infección por VSHV que en los de las truchas genéticamente resistentes al VSHV. Esto podría ser debido a que sólo las exposiciones más recientes al virus (lo que sólo sucede en las truchas supervivientes) aumentan su memoria inmunológica. De manera similar, la respuesta de anticuerpos anti-VSHV de las truchas solamente es detectable dos meses después de la infección (Enzmann, Konrad, 1993).

Aunque los determinantes presentados por las moléculas de histocompatibilidad y reconocidos por los linfocitos T en mamíferos son lineales, algunos resultados en rabia han sugerido la importancia de conformaciones estabilizadas por puentes disulfuro para la integridad de algunos determinantes inductores de linfoproliferación en la glicoproteína G (MacFarland, 1984). Ello podría explicarse por un requerimiento conformacional para un adecuado procesamiento proteolítico anterior a la presentación por moléculas de histocompatibilidad. La región aminoterminal inmunodominante en la glicoproteína G del VHSV comprende el mayor dominio hidrofílico de la glicoproteína G (desde la cisteína 110 a la 152) y un tramo de alta hidrofobicidad desde el aa 82 al 102 y 13 aa (110 al 122) con un 92,3 p. 100 de homología de secuencias entre el VSHV y el VNHI. El mayor dominio hidrofílico comprendido entre las dos cisteínas mencionadas anteriormente (110 y 152) podría además de contener determinantes inductores de linfoproliferación (Fig. 5) contener uno de los epítomos neutralizantes. Regiones similares de aa hidrofílicos comprendidos entre dos cisteínas, se pueden localizar por alineamiento en la región aminoterminal de otros rhabdovirus (no mostrado). Sólo en el caso de la rabia se ha demostrado que esta región contiene tanto determinantes inductores de la linfoproliferación (MacFarland *et al.*, 1984) como la mayoría de la antigenicidad de la glicoproteína G (Dietzschold *et al.*, 1982). Recientemente se ha descrito la localización de los epítomos T de la glicoproteína G en el virus de la vesicular stomatitis (VSV) utilizando ratones congénicos e híbridomas T (Burkhart, 1994). Los resultados obtenidos muestran una asombrosa identidad con los descritos para la rabia y para el VHSV (Fig. 5).

La región situada en la parte carboxiterminal de la glicoproteína G, contiene el dominio de anclaje transmembranal y la secuencia 357 ArgGlyAsp (RGD), que es la secuencia de reconocimiento para la fibronectina. En el VNHI (Xu *et al.*, 1991), la región carboxiterminal (del aa 350 al 450) induce una mayor protección in vivo que la región aminoterminal. Otros rhabdovirus han mostrado la presencia tanto de determinantes inductores de linfoproliferación, como de epítomos neutralizantes en sus regiones carboxiterminales (Fig. 5). Por ejemplo, dos epítomos neutralizantes se han mapeado entre los aa 286 y 428 del VSV-Indiana, los aa 333, 336 y 357 son esenciales para la neutralización de la rabia y uno de los epítomos neutralizantes se ha mapeado entre los aa 270 y 460 del VNHI (Xu *et al.*, 1991).

La identificación preliminar de inmunodominancia de las regiones amino y carboxi terminal (Fig. 5) en la glicoproteína G del VSHV (aún considerando la pequeña parte de la población de truchas ensayada y el que no ha sido posible ensayar cada péptido de la glicoproteína G), sugirió el ensayar fragmentos recombinantes de la glicoproteína G que contenían parte o todas estas regiones. Lo mismo que para los péptidos sintéticos, los fragmentos recombinantes de la glicoproteína G que contienen las regiones amino y carboxi terminales (G4) o solamente las regiones aminoterminales (G34) también estimularon la linfoproliferación anamnésica (Tabla 2).

La linfoproliferación inducida por los péptidos de la nucleoproteína N estaba aparentemente limitada a regiones variables de trucha a trucha, pero específicas ya

que las truchas no respondían a todos los péptidos de la nucleoproteína N (Figs. 1 y 2). La especificidad de estas respuestas linfoproliferativas a los péptidos de la nucleoproteína N también se demostró por la ausencia de linfoproliferación cuando se usaron truchas no infectadas (Fig. 1, trucha 6). El reconocimiento de los péptidos virales por truchas supervivientes a las infecciones por VHSV podría ser parte de una respuesta anamnésica, pero esto no aclara que mecanismos podrían explicar el reconocimiento de péptidos virales por truchas genéticamente resistentes. Que los mecanismos que operan en ambos casos podrían ser similares (aún contando con que algunos casos no son muy claros debido a la alta desviación estandar de algunos péptidos), lo sugiere el mayoritario reconocimiento de los mismos péptidos al menos en el caso de la nucleoproteína N, péptidos 49, 59, 169 y 289.

No se encontró suficiente evidencia de un posible comportamiento superantigénico de la nucleoproteína N como está descrito para otros rhabdovirus (Lafon, 1993) (aún cuando la Nx en una trucha mostró un altísimo IE). Los principales péptidos inmunodominantes indicados en la Figuras 1 y 2 definieron, al menos tres regiones en la nucleoproteína N, la región aminoterminal (que contiene el péptido inmunodominante 49), la región interna (que contiene el péptido 169) y la región carboxiterminal (con el péptido 289). Otras tres regiones homólogas se identificaron por comparación de los VHSV 07.71 y Makah (Bernard *et al.*, 1991). La región aminoterminal contiene uno de los picos hidrofílicos más altos de la nucleoproteína N (aminoácidos 40 al 57). Además contiene la secuencia XYVXQGX, que podría ser un candidato para un epítipo parcialmente conservado (conservados los aminoácidos subrayados) de los rhabdovirus (Estepa, Coll, 1993).

Hasta la fecha, la mayoría de los estudios sobre la respuesta inmune de los peces a los virus se habían realizado con mitógenos policlonales (Estepa, Coll, 1992b; Kaattari *et al.*, 1986), virus enteros (Chilmonczyk, 1978) o proteínas virales aisladas (Estepa, 1992; Estepa, Coll, 1992a) o recombinantes (Estepa *et al.*, 1994). El uso de péptidos virales puede ofrecer estudios complementarios de la inmunología viral en peces y puede ayudar a caracterizar sus linfocitos T.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Dr. Thiry de Eurogentec (Liege, Belgium) las proteínas recombinantes de VHSV, al Dr. M. Dorson de Jouy-en-Josas (INRA, France) las truchas genéticamente resistentes al VHSV y al Dr. Angel Ezquerro sus comentarios sobre el manuscrito. También se agradece a la D. Frías (INIA) y a la Dra. Monge (INRA) la realización de ELISAS y preparaciones celulares. Agradecemos la ayuda de J. P. Coll en el pasado a máquina. Este trabajo ha sido financiado por los proyectos de investigación CT94-1334 del AIR2 Program of the European Economic Community, AGF92-0059 de la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (CICYT), Spain, INIA-INRA cooperation projects PA01 and PA02, y por el proyecto INIA SC94-102.

SUMMARY

Lymphoproliferation stimulatory regions in the rhabdoviral haemorrhagic septicaemia of salmonids mapped by pepsan

Immunodominant lymphoproliferation regions of the nucleoprotein N and glycoprotein G of the viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) were mapped by in vitro lymphoproliferation/pepsan assays of leucocytes obtained of survivors of VHSV infection (anamnesic responses) and genetically

selected VHSV-resistant trout (genetic responses). Although lymphoproliferative responses varied individually from trout to trout, responses were higher in leucocytes obtained from survivors of VHSV infection than from genetically VHSV resistant trout. Recombinant fragments in both viral proteins showed a higher stimulation of lymphoproliferation than the synthetic peptides. The use of viral peptides, rather than whole virus or isolated viral proteins could be a complementary tool to the study of fish viral immunology.

KEY WORDS: Lymphoproliferation
Pepscan
Rhabdovirus
Haemorrhagic septicaemia
Salmonids

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- BASURCO B., 1990. Estudio, identificación y caracterización del virus de la septicemia hemorrágica vírica en España. Universidad Complutense de Madrid. (PhD Thesis), 178 p.
- BASURCO B., COLL J. M., 1992. In vitro and in vivo variability of the first haemorrhagic septicaemia virus isolated in Spain compared to international reference serotypes. *Res. Vet. Sci.*, 53: 93-97.
- BASURCO B., SANZ F., MARCÓTEGUI 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.
- BERNARD J., LeBERRE M. B., DeKINKELIN P., 1983. Viral haemorrhagic septicemia of rainbow trout: relation between the G polypeptide and antibody production of fish after infection with the F25 attenuated variant. *Infection and Immunity*, 39: 7-14.
- BERNARD J., LECOCQ-XHONNEUX F., ROSSIUS M., THIRY M. E., DeKINKELIN P., 1990. Cloning and sequencing the messenger RNA of the N gene of viral haemorrhagic septicaemia virus. *J. Gen. Virol.*, 71: 1669-1674.
- BERNARD J., BREMONT M., WINTON J., 1991. Sequence homologies between the N genes of the 07.71 and Makah isolates of viral, haemorrhagic septicaemia virus. In proceedings of the II International Symposium on viruses of lower vertebrates. Ed. Oregon State University, 109-116.
- BURKHART C., FREER G., CASTRO R., ADORINI L., WIESMULLER K. H., ZINKERNAGEL R. M., HENGARTNER H., 1994. Characterization of T-helper epitopes of the glycoprotein of the vesicular stomatitis virus. *Journal Virology*, 68: 1573-1580.
- CHICZ R. M., URBAN R. G., LANE W. S., GORGA J. C., STERN L. J., VIGNALI D. A. A., STROMIKNER J. L., 1992. Predominant naturally processed peptides bound to HLA-Drl are derived from MHC-related molecules and are heterogeneous in size. *Nature*, 359: 764-768.
- CHILMONCZYK S., 1978. Stimulation spécifique des lymphocytes de truites arc-en-ciel (*Salmo gairdneri*) résistantes à la septicémie hemorrhagique virale. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 287: 387-389.
- 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. *J. Virology*, 44: 595-602.
- DORSON M., TORCHY C., 1993. Viral haemorrhagic septicaemia virus replication in external tissue excised from rainbow trout, *Onchorhynchus mykiss* (Walbaum), and hybrids of different susceptibilities. *J. Fish Dis.*, 16: 403-408.
- ELLIS E. A., 1988. Fish Vaccination. Academic. Press. London, 300 p.
- ENGELKING H. M., LEONG J. C., 1989. The Glycoprotein of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) eliciting antibody and protective responses. *Virus Res.*, 13: 213-230.
- ENZMANN H., KONRAD M., 1993. Longevity of antibodies in brown trout and rainbow trout following experimental infection with VHS virus. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 13: 193-194.
- ERTL H. C. J., DIETZSCHOLD B., GORE M., OTVOS L., LARSON J. K., WUNNER W. H., KOPROWSKI H., 1989. Induction of rabies virus-specific T-Helper cells by synthetic peptides that carry dominant T-Helper cell epitopes of the viral ribonucleoprotein. *J. Virology*, 63: 2885-2892.
- ESTEPA A., 1992. Estudios de inmunización con proteínas electroeluidas y clonadas del virus de la septicemia hemorrágica vírica de la trucha. University of Madrid. Spain. Doctoral Thesis, PHD Thesis, 243.
- 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., 1992a. In vitro immunostimulants for optimal responses of kidney cells from healthy trout and from trout surviving viral haemorrhagic septicaemia virus disease. *J. Fish Shellfish Immunol.*, 2: 53-68.
- ESTEPA A., COLL J. M., 1992b. Mitogen-Induced proliferation of trout kidney leucocytes by one-step culture in fibrin clots. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 32: 165-177.

- ESTEPA A., COLL J. M., 1993. Enhancement of fish mortality by rhabdovirus after immunization with a nucleoprotein peptide. *Viral Immunol.*, 6: 237-243.
- 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.
- 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.
- JOHNSON K. A., FLYNN J. K., AMENE D. F., 1982. Onset of immunity in salmonid fry vaccinated by direct immersion in vibrio angillarum and yersinia ruckeri bacterins. *J. Fish Dis.*, 5: 197-205.
- KAATTARI S. L., IRWING M. J., YUI M. A., TRIPP R. A., PARKINS J. S., 1986. Primary in vitro stimulation of antibody production by rainbowtrout lymphocytes. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 12: 29-38.
- 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 Immunol.*, 5: 213-220.
- LAFON M., 1993. Rabies virus superantigen. *Res. Immunol.*, 3: 209-213.
- LAFON M., LAFAGE M., MARTINEZ-ARENDIS A., RAMIREZ R., VUILLIER F., CHARRON D., LOTTEAU V., SCOTT-ALGARA D., 1992. Evidence for a viral superantigen in humans. *Nature*, 358: 507-510.
- LE BERRE M., DE KINKELIN P., METZGER A., 1977. Identification sérologique des rhabdovirus des salmonidés. *Bull. Off. Inter. Epiz.*, 87: 391-393.
- LEONG J. C., FRYER J. L., 1993. Viral vaccines for aquaculture. *Am. Rev. Fish Dis.*, 225-240.
- LORENZEN N., OLESEN N. J., VESTERGAARD-JORGENSEN P. E., ETZERODT M., HOLTET T. L., THORGENSEN 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. *J. Gen. Virol.*, 74: 623-630.
- MACFARLAND R. I., DIETZSCHOLD B., WIKTOR T. J., KIEL H., HOUGHTEN R., LERNER R. A., SUTCLIFFE J. G., KOPROWSKI H., 1984. T cell responses to cleaved rabies virus glycoprotein and to synthetic peptides. *J. Immunol.*, 133: 2748-2752.
- OBERG 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. *J. Virol.*, 65: 4486-4489.
- OLESEN N. J., LORENZEN N., VESTERGAARD-JORGENSEN P. E., 1991. Detection of rainbow trout antibody to Egtved virus by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), immunofluorescence (IF), and plaque neutralization tests (50 p. 100 PNT. *Dis. Aquat. Organ.*, 10: 31-38.
- OU D., CHONG P., TRIPET B., GILLAM S., 1992. Analysis of T-and-B cell epitopes of capsid protein of rubella virus by using synthetic peptides. *J. Virol.*, 66: 1674-1681.
- PARTULA S., FELLAH J. S., DEGUERRA A., CHARLEMAGNE J., 1994. Caractérisation d'ADNc de la chaîne β du récepteur des lymphocytes T chez la truite arc-en-ciel. *Concepts Rendues Académie Sciences Paris*, 317: 765-770.
- ROGEL-GAILLARD C., CHILMONCZYK S., DEKINKELIN P., 1993. In vitro induction of interferon-like activity from rainbow trout leucocytes stimulated by Egtved virus. *Fish & Shellfish Immunol.*, 3: 382-394.
- SANCHEZ C., DOMINGUEZ J., COLL J. M., 1989. Immunoglobulin heterogeneity in the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *J. Fish Dis.*, 12: 459-465.
- SANZ F., COLL J. M., 1992. Detection of viral hemorrhagic septicaemia virus by ELISA using two non-competitive monoclonal antibodies the early nucleoproteins at high salt concentration. *Am. J. Vet. Res.*, 53: 897-903.
- STET R. J. M., EGBERTS E., 1991. The histocompatibility system in teleostean fishes: From multiple histocompatibility loci to a major histocompatibility complex. *J. Fish Shellfish Immunol.*, 1: 1-16.
- TATNER M. F., 1990. Antigen-induced blastogenesis of salmon, *Salmo Salar*, L., head kidney leucocytes to modified aeromonas salmonicida antigens: a preliminary evaluation method for potential vaccine antigens. *J. Fish Biol.*, 36: 731-739.
- THIRY M., LECOQ-XHONNEUX F., DHEUR I., RENARD A., KINKELIN D., 1991. 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.
- VALLEJO A. N., MILLER N. W., CLEM L. W., 1991. Phylogeny of immune recognition: role of allo-antigens in antigen presentation in channel catfish immune responses. *Immunology*, 74: 165-168.
- VERLHAC V., MIREILLE S., DESCHAUX P., 1990. Cytotoxicity of carp (*Cyprinus carpio*) Leucocytes induced against TNP-modified autologous spleen cell and influence of acclimatization temperature. *Dev. Comp. Immunol.*, 14: 475-480.
- XU L., MOURICH D. V., ENGELKING H. M., RISTOW S., ARNSEN 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.