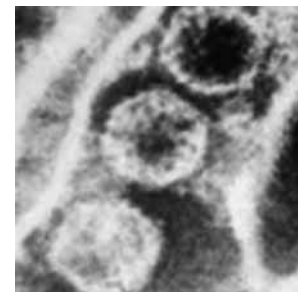


Virus de salmónidos y vacunas DNA



Sylvia Rodríguez Saint-Jean y Sara Isabel Pérez Prieto.

Grupo de Virología en Acuicultura. Centro de Investigaciones Biológicas-CSIC-
Departamento de Microbiología Molecular y Biología de la Infección.

C/ Ramiro de Maeztu, 9, 28040 Madrid

Los brotes de enfermedades producidas por microorganismos se consideran una importante restricción para la producción en acuicultura y aquellas cuyo agente etiológico es un virus están afectando al desarrollo económico del sector en numerosos países. Entre los virus que producen mayores pérdidas económicas internacionalmente cabe mencionar al **virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV)**, de la familia *Birnaviridae* y género *Aquabirnavirus* y de especial interés en nuestro país porque es el de mayor prevalencia, al virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (IHNV) y al virus de la septicemia hemorrágica viral (VHSV) que pertenecen a la familia *Rhabdoviridae*, género *Novirhabdovirus*. Tanto IPNV como IHNV son capaces de inducir persistencia y en animales supervivientes a la infección se produce un estado de portador (*carrier*) asintomático. El IPNV es muy simple y extraordinariamente estable y se caracteriza por poseer un genoma RNA de doble cadena y de dos segmentos, A y B, dentro de una cápsida icosaédrica sin envuelta.

El segmento A del RNA contiene dos pautas de lectura abierta (ORF). La de mayor tamaño codifica una poliproteína precursora que es escindida por la proteasa viral no estructural (NS) VP4 o puede que por proteasas celulares para generar las proteínas maduras estructurales VP2 y VP3. La ORF de menor tamaño, que precede y se solapa parcialmente con la ORF de la poliproteína, codifica una proteína NS de 17 kDa conocida como VP5. El segmento B codifica una proteína de 94 kDa, VP1 que es la RNA polimerasa RNA-dependiente del virión. Existen diversas revisiones sobre el virus, algunas de miembros de este Grupo Especializado de la SEM. En nuestro país, el primer equipo de microbiólogos que inició a comienzos de los 80 estudios globales sobre enfermedades bacterianas y víricas en peces, es el de los Dres Alicia Estévez Toranzo y Juan Luis Barja, de la Universidad de Santiago de Compostela, que generosamente nos ayudaron a los demás en nuestros comienzos en los años 90.

GRUPO DE VIROLOGÍA DEL CIB

A nuestro equipo le interesó en primer lugar la epidemiología para tener una visión de conjunto de los virus que podían aislarse en las instalaciones de trucha arco-iris (cultivo

continental mayoritario en España) y disponer de aislados autóctonos. Así llegamos también al estudio de la interferencia vírica que observamos en una coinfección natural IPNV-IHNV y pudimos reproducirla en el laboratorio. En esta coinfección se manifiesta una inactivación del IHNV inducida por IPNV. Comprobamos que esta interferencia produce una disminución significativa del título infectivo, por inhibición de la síntesis de RNA viral, y a la que podría contribuir también la actividad antivírica mediada por interferón. Esta actividad es diferencial entre rhabdovirus, pues demostramos que la presencia de IPNV no inactiva al virus VHSV. A partir de este hallazgo nos interesó explorar los niveles de protección frente a distintos virus. Así, en células estimuladas con inductores de IFN demostramos una acción inhibitoria alta frente a IHNV pero no frente a VHSV, y utilizando la proteína antivírica Mx como marcador de interferón, determinamos la relación entre presencia de Mx y disminución de infección. Hemos comprobado altos niveles de protección para IPNV, IHNV y para la coinfección de ambos, que, en el caso del IHNV, alcanzan el 100%.

Paralelamente, establecimos una activa colaboración con el Grupo de Microbiología de Juan José Borrego, de la Universidad de Málaga para estudiar virus del entorno marino y técnicas de detección y con Carolina Tafalla del CISA-Valdeolmos (INIA) de Madrid, para determinar la estimulación del sistema inmune innato en truchas vacunadas frente IPNV o VHSV.

VACUNAS

Todo lo relacionado con protección frente a estos virus ha sido y es una línea de investigación de gran interés, en especial la que implica el diseño de vacunas. La consecución de vacunas eficaces frente a virus, es un objetivo aún no alcanzado en la industria de la acuicultura. Dentro de las iniciativas ejercidas con mayor éxito experimental en los últimos años, las vacunas DNA ofrecen las mejores perspectivas; de ellas, las de rhabdovirus de salmónidos son las más desarrolladas. Las vacunas DNA frente a IPNV, aún están poco exploradas, pese a ser el virus de mayor prevalencia y cada vez de más interés en Europa y Latinoamérica porque: 1) afecta también a peces de mayor tamaño y valor comercial, 2) presenta coinfecciones con otros virus (IHNV, anemia

Miembros del Grupo (de izquierda a derecha): Sara Isabel Pérez Prieto, y Sylvia Rodríguez Saint-Jean, Investigadoras Titulares, Ana I de las Heras, becaria, Mercedes Sánchez Carmona y Luis Guaita Beneit, Ayudantes de Investigación.



infecciosa del salmón-ISA(-) y 3) porque los portadores asintomáticos del virus, no sólo contribuyen a mantenerlo y dispersarlo en la instalación, sino que presentan mayor susceptibilidad a infecciones bacterianas oportunistas.

Así, en nuestro laboratorio hemos construido plásmidos con el inserto del gen VP2 o del ORF de la poliproteína del virus IPN, que se han probado mediante inyección intramuscular, en trucha común y arco-iris. Demostramos que inducían expresión de IFN y Mx, así como anticuerpos neutralizantes y niveles de protección altos en infecciones a los 15 y 30 días postvacunación.

VACUNAS ORALES

Hasta ahora, la ruta más frecuente de administración para las vacunas DNA es la intramuscular. No obstante, la administración de una vacuna por inyección a peces es una tarea demasiado laboriosa y problemática, sobre todo en los de pequeño tamaño, que generalmente son los más susceptibles a la infección. Se están estudiando otras rutas alternativas como la vacunación en masa por vía oral o por baño inmersión. La sonicación y el choque hiperosmótico parecen mejorar el resultado de la vacunación por baño-inmersión. La vacunación oral apenas ha sido explorada aunque tiene numerosas ventajas pues es fácil de administrar, se pueden inmunizar animales muy pequeños, tiene menor coste y sirve para preparar vacunas multivalentes. Cuando la vacuna se administra por vía oral las células diana son las de la mucosa entérica. Para evitar que la vacuna DNA se inactive por ácidos gástricos y enzimas digestivas presentes en el tracto gastrointestinal debe estar contenido en una formulación que proteja al antígeno.

Por todo esto, consideramos de especial interés nuestro último trabajo que, hasta donde sabemos, es la primera descripción de una vacuna DNA oral para virus de salmónidos. En él demostramos que la vacuna pDNA-VP2 administrada por vía oral (protegida en microesferas de alginato) es eficaz frente a IPNV, logrando más de un 80 % de protección y una

disminución de portadores del virus. El éxito completo de una vacuna radicaría no solo en la protección eventual y disminución de mortalidad de una población determinada, sino en impedir la supervivencia del virus en forma persistente, y con ello, evitar los portadores de virus, que transmiten vertical y horizontalmente la infección. Aun hay pocos estudios sobre sistema inmune y portadores de IPNV. Además, puesto que las vacunas DNA orales apenas ahora comienzan a ensayarse en peces, se sabe poco de los mecanismos involucrados en la incorporación y presentación del antígeno tras su administración. En nuestro trabajo hemos detectado los transcritos exógenos en diversos órganos a los 7 días postvacunación y la expresión de VP2 se mantiene en hígado, bazo y ciegos pilóricos a los 15, 30 y 60 días tras la vacunación oral. El riñón se perfila de nuevo como un órgano diana para la detección y evaluación de la eficacia de la vacuna y de la actividad viral. Dedujimos que la protección observada se explica por una combinación de la inducción de respuesta inmune innata (a niveles similares que la obtenida tras vacunación intramuscular) y respuesta inmune específica, con títulos neutralizantes anti-IPNV considerables. El nivel máximo de expresión del mRNA de Mx se detectó a los 15 días post-vacunación y la protección se relaciona directamente con la expresión de VP2, puesto que el plásmido sin inserto no induce Mx ni IFN. Es interesante resaltar que los niveles de virus encontrados en peces vacunados supervivientes tras 45 días de infección con el virus, fueron inexistentes o mínimos.

En la actualidad nos planteamos estudiar el potencial protector frente a los virus IPNV e IHNV de plásmidos de expresión de genes que codifican las proteínas antigénicas de cada virus, su sinergia si son administrados conjuntamente y su capacidad para eliminar/reducir los estados de persistencia viral y por tanto, la aparición de peces portadores asintomáticos del virus. Todo ello utilizando preferentemente la administración oral, en el modelo trucha arco iris y en trucha común. En este contexto, nos interesa también el

estudio de la expresión génica en respuesta a las vacunas DNA. Hasta ahora se han venido analizando mediante PCR semi-cuantitativa y PCR en tiempo real pero dado que muy recientemente, Agilent ha comercializado una micromatriz (*microarray*) de 35K para trucha arco iris, nos proponemos aplicarlo en nuestros próximos ensayos de vacunas, y determinar los cambios en la expresión de series de genes relacionados con inmunidad y/ o virulencia.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos la excelente labor técnica de Mercedes Sánchez y Luis Guaita, del personal técnico de los diversos Servicios del CIB y la colaboración de la Delegación Provincial de Medio Ambiente y Desarrollo Rural en Cuenca, que ha proporcionado las truchas de experimentación. El grupo ha sido subvencionado por el Ministerio de Ciencia e Innovación en sucesivos Planes Nacionales (actualmente AGL2007-60256/ACU).

ALGUNAS PUBLICACIONES DEL GRUPO

Rodríguez, S, Alonso, M & Pérez-Prieto, S.I. 2005. Comparison of two birnavirus-rhabdovirus coinfections in fish cell lines. *Dis Aquatic Org* 67: 183-190

Pérez Prieto, S I & Rodríguez Saint-Jean, S. 2005. Enfermedades virales de peces objeto de cultivo. En: *Inmunología e inmunopatología en piscicultura*. pp 61-85. Chaves, García y Messeguer Eds. Universidad de Murcia/Universidad Internacional del Mar. pp 61-85

Rodríguez Saint-Jean, S & Pérez Prieto, S I. 2005 Resistencia a la infección por virus de salmónidos: inducción y potenciación de un estado antivírico celular. *Boletín IEO* 21 (1-4): 121-130

Rodríguez Saint-Jean, S & Pérez-Prieto, S.I. 2006. Interferon mediated antiviral activity against salmonid fish viruses in BF-2 and other cell lines. *Vet Immunol & Immunopathol* 110: 1-10.

Tafalla, C, Rodríguez Saint-Jean, S & Pérez-Prieto, S.I. 2006. Immunological consequences of the coinfection of brown trout (*Salmo trutta*) with infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) and infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). *Aquaculture* 256:15-22

Rodríguez & Pérez Prieto S.I. (2007). Effects of salmonid fish viruses on Mx gene expression and resistance to single or dual viral infections. *Fish & Shellfish Immunol* 23: 390-400,

de las Heras, A., Rodríguez Saint-Jean, S. & Pérez-Prieto, S.I., (2008) Salmonid fish viruses and cell interactions at early steps of the infective cycle. *J Fish Dis* 31: 535-546.

de las Heras, A. Pérez Prieto, S.I. & Rodríguez Saint-Jean, S., (2009) In vitro and in vivo immune responses induced by a DNA vaccine encoding the VP2 gene of the infectious pancreatic necrosis virus. *Fish & Shellfish Immunol* 27: 120-129.

Rodríguez Saint-Jean, Ana I de las Heras, Sara I Perez-Prieto. (2010) The persistence of infectious pancreatic necrosis virus and its influence on the early immune response. *Vet Immunol & Immunopathol*, 31; 535-546

De las Heras, A, Rodríguez Saint-Jean, S and Pérez-Prieto, S.I. (2010). Immunogenic and protective effects of an oral dna vaccine against infectious pancreatic necrosis virus in fish. *Fish & Shellfish Immunol* 28:562, (doi:10.1016/j.fsi.2009.12.006).

Cuesta, E. Chaves-Pozo, A. I. de las Heras, S. Rodríguez Saint-Jean, S. Pérez-Prieto, C. Tafalla (2010) An effective fish DNA vaccine against infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) with a different mode of action than rhabdovirus DNA vaccines *Vaccine* 28: 3291-3300.