

RABDOVIRUS DE PECES

Estepa A, Basurco B y Coll JM.

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

Resumen

En los peces teleosteos se han aislado representantes de la mayoría de las principales familias víricas. Entre los virus de peces más virulentos destacan los rhabdovirus. Los rhabdovirus afectan, tanto a especies de peces tradicionalmente cultivadas (trucha, salmón), como a especies con perspectivas de incipiente o futuro cultivo (lubina, rodaballo, anguila) y también a especies silvestres (carpa, lucio) incluidos algunos crustáceos (langostinos). Otros virus de peces que se han aislado de animales asintomáticos, por ejemplo los herpes, se están actualmente desarrollando como posibles vectores. Finalmente, algunos virus sólo se han encontrado en peces, por ejemplo, el linfocistis y los aquareovirus. En este trabajo se revisa principalmente el estado actual de las investigaciones sobre los rhabdovirus de peces que son los que actualmente junto con los birnavirus están más estudiados. Los estudios actuales se centran principalmente en nuevos métodos de detección, secuenciación completa del genoma de varios rhabdovirus, obtención de DNA de rhabdovirus infectivos para genética reversa, estudios filogenéticos comparando secuencias de diversos aislados, mecanismos de entrada vírica, estudios sobre las respuestas inmunológicas a la infección rhabdoviral, vacunas por subunidades recombinantes, vacunación DNA y peces transgénicos resistentes a las rhabdovirosis.

VIRUS DE PECES

Los estudios sobre virus de peces comenzaron hace más de treinta años con el primer aislamiento del birnavirus causante de la necrosis pancreática infecciosa (NPI). Estos estudios experimentaron un fuerte impulso a partir del desarrollo de la primera línea celular estable de peces (124). A partir de esta fecha el número de virus identificado en peces no ha dejado de crecer y pocos años más tarde ya se habían aislado 42 y clasificado hasta 25 virus de peces (125, 127). Actualmente entre los virus clasificados se encuentran tanto virus RNA como DNA, con o sin envoltura (Tablas 1 y 2). La mayoría pertenecen a las familias rhabdoviridae, birnaviridae, retroviridae, herpesviridae e iridoviridae (88). Algunos de estos virus se encuentran sólo en peces, por ejemplo el linfocistis (126), clasificado dentro de la familia Iridoviridae y los aquareovirus, un tipo de virus relativamente avirulentos dentro de la familia

Reoviridae. Algunos aquareovirus se están utilizando como inmunógenos para inducir resistencia inespecífica contra rhabdovirus (70), la misma estrategia que se está utilizando con otros virus avirulentos aislados en peces (56). Otros virus de peces de baja patogenicidad se están utilizando para desarrollar posibles vectores, como los herpes del pez gato (132) y de los salmónidos (proyecto FAIR CT-95-0850).

Otros virus aún no clasificados se han descrito o se sospechan asociados a distintas manifestaciones clínicas presentes en peces enfermos, tales como por ejemplo: infección eritrocítica de la lubina (104), neuropatía de la lubina (51), papiloma del pez de gato, paramyxovirus-like del salmón Chinook, papiloma de la dorada, intraeritrocítico de la trucha arco iris, hiperplasia epidérmica de la trucha lacustre Americana, papiloma epidérmico de los pleuronéctidos, anemia de los salmónidos, estomatopapiloma de la anguila, papilomatosis de la platija, melanoma híbrido del Xiphophorus, etc. (88). El número de virus de peces aislados e identificados sigue en continuo aumento. Además, en muestras de agua marina se pueden aislar otros tipos de virus cuyos huéspedes acuáticos son actualmente desconocidos, sin más que filtrar y concentrar el agua (105).

De todos los virus de peces actualmente conocidos, los rhabdovirus (75) junto con los birnavirus (90) constituyen el grupo más numeroso. De estos dos grupos, los rhabdovirus tienen una mayor incidencia económica porque causan altas mortalidades en adultos en las explotaciones piscícolas de todo el mundo. No es sorprendente el que sus aislamientos reflejen la evolución geográfica del cultivo intensivo de peces durante las últimas décadas (Figura 1). Aunque ya se han descrito más de 20 tipos de rhabdovirus de peces (Tablas 3 y 4), la mayoría no han sido caracterizados todavía. Algunos aislados son similares a otros virus ya descritos, mientras que otros pueden representar variantes bioquímicas o antigénicas de un mismo serotipo (Tabla 4) (50). Entre los rhabdovirus de peces más estudiados destacan los que afectan a teleósteos de agua fría como el virus de la Septicemia Hemorrágica Vírica (SHV) y el virus de la Necrosis Hematopoyética Infecciosa (NHI) y los que afectan a teleósteos de aguas templadas como el virus de la viremia primaveral de la carpa (VPC). Estos tres virus destacan por que son los que causan mayores pérdidas económicas en Acuicultura. Los 3 han sido diagnosticados en España en los últimos años (Figura 1).

Virus de a Septicemia hemorrágica vírica (SHV). El virus de la SHV, también llamado virus de Egtved, es endémico en Europa y afecta a varias especies (Tabla 5). Se han demostrado infecciones experimentales en la lubina y el rodaballo (16), y se ha aislado en cultivos de las especies: rodaballo (114), anguila, lenguado y langostino (77). Recientemente también se ha aislado en Norteamérica a partir de salmón, bacalao y arenque (17, 59, 122). Se conocen cuatro serotipos, siendo el serotipo I el más difundido (89, 99). En España (Figura 1), el INIA ha aislado e identificado 7 brotes de esta enfermedad de los que se han caracterizado 5 (6).



Tabla 1
Virus DNA aislados en peces (88)

Virus	Especie afectada
Adenovirus	Esturión Blanco
	Bacalao del Atlántico
	Barbada
	Trucha Arco Iris
Herpesvirus	Pez Gato
	Salmónidos Norteamericanos
	Trucha «Steelhead»
	Salmónidos Japoneses
	Oncorhynchus Nerka
	Oncorhynchus masou
	Tumor de Yamame
	Cyprinidos
	Pércidos
	Esócidos
	Rodaballo
	Bacalao del Pacífico
Iridovirus	Linfocistis de la Dorada
	Necrosis Eritrocítica
	Perca del Lago Nillahcootie
	Carpin Dorado
	Anguila Japonesa
	Necrosis de la Branquia de la Carpa
	Síndrome Ulcus del Bacalao

Virus de la Necrosis Hematopoyética Infecciosa (NHI). Se han estudiado las características de crecimiento, el patrón electroforético de sus proteínas, fingerprinting con T1 (102), comparaciones de secuencias y reacciones con AcM (69) de abundantes aislados, pero sólo se ha observado un serotipo. El VHSV (30) originario de Europa es similar al VNHI (65) originario de Norteamérica, pero no tienen reacciones cruzadas de seroneutralización. Hace pocos años se detectó por primera vez NHI en Francia (10) y en Italia (15). En 1991 se detectó en los Pirineos franceses (Dr. J. Adroit, O.I.E. 1991, pág. 136) y en 1993 en España (109, 119).

Virus de la Viremia Primaveral de la Carpa (VPC). En este grupo se incluyen aislados de carpa y otros aislados de peces de agua dulce templada de Europa. Aunque se han encontrado reacciones serológicas cruzadas entre VPC y el pike fry rhabdovirus (PFR). Sin embargo estudios de sus secuencias parecen confirmar que se trata de virus diferentes (14). El VVPC se detectó simultáneamente por primera vez en varios pantanos del centro de España en 1990 (86) y se han efectuado aislados casi todos los años desde entonces.

Pike Fry Rhabdovirus (PFR). Aunque el PFR ha sido aislado en diferentes especies de peces de Europa, existen pocos estudios comparativos de este virus. La posible relación entre VVPC y el VPFR hacen deseable la realización de más estu-

Tabla 2
Virus DNA aislados en peces (88)

Virus	Especie afectada
Rabdo virus (Ver Tabla 3)	
Birnavirus	Salmónidos (todos los teleósteos en general y moluscos) Necrosis Pancreática Infecciosa (VNPI)
Calicivirus	León Marino de San Miguel
Reovirus	Salmón Chum Pez Gato Carpa Hervíboras
Retrovirus	Fibrosarcoma del Salmón Atlántico
	Papiloma del Salmón Atlántico
	Hiperplasia Epidérmica del Lucio
	Linfosarcoma del Lucio
	Sarcoma del Lucio
	Sarcoma Dérmico del «Walleye» (Stzostedion sp.)
	Hiperplasia Epidérmica Discreta del «Walleye» (Stzostedion sp.)
	Papiloma Epidérmico del Catostomus sp.
	Neuroblastoma del Xiphosporus sp.

dios, principalmente a nivel de secuenciación, con objeto de poder establecer una posible relación entre ambos virus y la diversidad existente para los aislados de cada virus (14).

Hirame Rhabdovirus (HRV). El HRV puede diferenciarse fácilmente del VNHI y de otros rhabdovirus de peces mediante seroneutralización, mientras que los distintos aislados de HRV de diferentes especies de peces cultivadas en Japón son bioquímica y serológicamente indistinguibles. Por otra parte, los HRV comparten antígenos con las proteínas G, N y M2 del VNHI y con la proteína G del VSHV.

Rhabdovirus de la anguila. Dentro de este grupo se clasifican virus aislados en diferentes partes del mundo. El primer virus en ser aislado fue el «Eel Virus American» (EVA). Existe un solo serotipo de virus de anguila tipo Vesiculovirus en el que se incluyen los EVA, Europ. X, C30, B44 y D13. Otros rhabdovirus de anguila tipo Lyssavirus, los L59 (18), B12 y C26 son bioquímicamente (perfil de proteínas) y serológicamente diferentes de los otros rhabdovirus de anguila tipo Vesiculovirus. Sin embargo, aún no existen suficientes estudios serológico-bioquímicos que puedan definir correctamente la relación entre todos estos rhabdovirus aislados en anguilas.

Rhabdovirus del Snakehead. El «Snakehead Rhabdovirus» (UDRV) tiene un patrón electroforético de proteínas típico Lyssavirus y temperatura óptima de crecimiento moderadamente elevada. Este virus es distinguible mediante neutralización de los virus NHI, SHV, HRV, VPC, PFR o HRV.

Tabla 4
Clasificación propuesta para los rabdovirus peces (123, 128)

A. Virus con patrón electroforético Lyssavirus

- Grupo I. Cuatro virus de la Septicemia Hemorrágica Viral (SHV).
 Cuatro serotipos, siendo el serotipo I el más difundido. Se incluyen los aislados de diferentes especies de peces (principalmente trucha arco iris) de Europa, así como el virus de Egtved, el cod ulcer syndrome rhabdovirus, el brown trout rhabdovirus, y diferentes aislados de salmón y otras especies marinas de Norteamérica.
- Grupo II. Virus de la Necrosis Hematopoyética Infecciosa (NHI).
 Un serotipo con muchos aislados americanos entre los que se incluyen el Sacramento River chinook virus, Oregon sockeye virus, y otros aislados de Japón, Taiwan, Korea, Europa y China.
- Grupo III. Hirame Rhabdovirus (HRV) o Rhabdovirus olivaceus.
 Un serotipo con todos los aislados japoneses.
- Grupo IV. Otros virus tipo-lyssavirus parcialmente caracterizados.
 Snakehead rhabdovirus, Eel Rhabdovirus B12 y C26.

B. Virus con patrón electroforético Vesiculovirus

- Grupo I. Viremia Primavera de la Carpa (VPC).
 Un serotipo. Se incluye el Rhabdovirus carpio, swim bladder inflammation virus y otros aislados de peces de aguas dulces y cálidas de Europa.
- Grupo II. Pike Fry Rhabdovirus (PFR).
 Un serotipo en el que se incluyen el grass carp virus y otros aislados de peces de aguas dulces y cálidas de Europa.
- Grupo III. Rhabdovirus de la anguila.
 Un serotipo en el que se incluyen eel virus American (EVA), eel virus European X (EVEX), eel virus C30, eel virus B44 y eel virus D13.
- Grupo IV. Otros virus tipo vesiculovirus.
 Ulcerative disease rhabdovirus of snakehead (UDRV).
- Grupo V. Otros vesiculovirus.
 Perch Rhabdovirus, Pike Perch Rhabdovirus and Pike Rhabdovirus.

C. Virus aún sin clasificar

Río Grande Perch virus, Perch Rhabdovirus, Pike Perch Rhabdovirus, Rhabdovirus salmonis, etc.

Aislamiento y detección de rabdovirus en peces. La mayoría de los rabdovirus pueden cultivarse en una amplia gama de líneas celulares de peces, tanto de líneas provenientes de especies susceptibles a la infección como de líneas de especies no susceptibles (Tabla 3). Entre las líneas celulares de peces más utilizadas para el cultivo de los rabdovirus están: Epitelioma Papulosum Ciprini (EPC), Rainbow Trout Gonad (RTG-2), Fathead Minnow (FHM), Chinook Salmón Embryo (CHSE-214) y Bluegill (BF-2). Se ha demostrado que el VSHV puede replicarse también en células de mamífero a temperaturas bajas (BHK-21), de reptiles (GL-1 y TH-1 de insectos (H5) (78).

Al igual que otros virus de peces, los rabdovirus de peces son capaces de replicar en una amplia gama de temperaturas (10-30°C), existiendo una temperatura óptima para cada grupo (Tabla 3). El efecto citopático producido por todos los rabdovirus de peces en cultivos celulares es bastante similar, produciéndose placas de lisis en las zonas afectadas, generalmente 2-5 días después de la infección. Durante la infección por rabdovirus se producen, simultáneamente, viriones infectivos y partículas defectivas no infectivas pero interferentes de la

infección. La existencia de partículas defectivas sólo ha sido demostrada en VSHV, VNHI, VPC y EVA (50).

Las técnicas tradicionales de cultivo celular que se usan para incrementar el número de virus y las técnicas más usadas para su identificación, tales como la neutralización (82) y la inmunofluorescencia, están siendo poco a poco sustituidas por otras tecnologías. Gracias a los desarrollos en anticuerpos monoclonales (AcM) y en amplificación de DNA por polimerasas termoestables (PCR), se está aumentando tanto la especificidad como la sensibilidad, de tal manera que pronto se logrará la detección de virus animales portadores y en huevos. El uso de ELISA+PCR puede contribuir a la automatización de ensayos con la suficiente sencillez y sensibilidad como para su utilización rutinaria en diagnóstico (48). Otros métodos, tales como la medida de anticuerpos anti-virus por ELISA o la reestimulación de la memoria celular inmunológica en peces afectados, no están suficientemente desarrollados (112).

Biología Molecular de los rabdovirus de peces. Su estudio es incipiente si se compara con la extensión de estudios similares en el virus de la rabia o en el virus de la estomatitis vesi-



cular (VSV). No obstante, en los últimos años, se ha secuenciado el genoma completo del VNHI (61, 93, 96, 101, 116) y partes importantes del VPC y del HRV (14). Estudios similares en el VSHV están avanzando actualmente a buen ritmo (Benmansour, comunicación personal) (8, 61). Además ya se han publicado varios estudios comparativos de secuencias y se trabaja en la obtención de virus infectivos tanto de VNHI, como de VSHV a partir de cDNA (reverse genetics) tal y como ya se ha conseguido en rabia y en VSV (92, 115, 120).

Estudios sobre los mecanismos de entrada vírica. Son escasos si se comparan con los numerosos estudios sobre el virus de la rabia o el VSV (91). Sin embargo son necesarios si se quieren conocer los mecanismos de entrada viral y la posibilidad de interferir con los primeros pasos de la infección aprovechando la facilidad de acceso al huésped a través del agua.

A nivel del organismo, se desconoce actualmente el tejido de entrada de los rabdovirus en los peces a pesar de algunos estudios infructuosos sobre las branquias. Estudios inmunohistoquímicos recientes proponen el esófago como la zona de entrada de los rabdovirus (57), pero estos estudios son incipientes y faltan todavía confirmaciones de sus conclusiones.

Pocos estudios han abordado las dianas celulares del VNHI o del VSHV. Se sabe sin embargo, que afecta a los leucocitos entre otras células (23, 42, 57).

A nivel molecular/celular se han hecho algunos avances, gracias sobre todo a estudios comparativos de secuencias con otros rabdovirus de mamíferos (37). Por ejemplo, se han localizado en la secuencia de la proteína G de todos los rabdovirus (rabia, VSV, rabdovirus de peces y plantas) al menos dos regiones de varias héptadas (abcdefg) con aminoácidos hidrofóbicos en posiciones a-d. Estas regiones están relacionadas topográficamente con los llamados péptidos de fusión identificados por mutagénesis en rabia y en VSV (37). La G del VHSV es singular a este respecto ya que en ella existen 3 regiones de heptadas hidrofóbicas (26). Debido a que en otros virus los péptidos sintéticos correspondientes a heptadas hidrofóbicas son potentes inhibidores de sus infecciones (62, 68, 107, 131), es posible que suceda lo mismo en los rabdovirus. Ello abriría posibles aplicaciones, especialmente en el caso de los rabdovirus de peces.

Utilizando ensayos de ligamiento en fase sólida, se ha podido identificar un dominio interacción con fosfolípidos localizado en las heptadas hidrofóbicas de VSHV (27, 46, 47), con secuencias conservadas en 7 aislados diferentes de VHSV (Benmansour, comunicación personal). Además existe una dependencia de pH similar en la unión de fosfolípidos y en la fusión vírica con la célula (72) y anticuerpos anti-dicho dominio inhiben la fusión (46). El significado biológico de estas interacciones *in vitro* está actualmente en estudio.

Respuestas inmunológicas de los peces a las infecciones virales. Se sabe que los peces sólo tienen respuestas inmunológicas humores de IgM, su sistema de histocompatibilidad está aún poco caracterizado, tienen células IgM + (linfocitos

Tabla 5
Especies de peces susceptibles a la
Septicemia Hemorrágica Vírica

Especie afectada	País primer aislamiento	Año
Trucha	Francia, Dinamarca	1963
Salmón coho	USA	1989
Salmón chinook	USA	1989
Bacalao del Atlántico	Dinamarca, USA	1979
Rodaballo	Alemania	1991
Anguila	Francia	1992
Arenque	USA	1994

Datos recopilados de distintos autores. El VSHV está ampliamente distribuido por Europa incluso en especies marinas (114) y se aisló en España por primera vez en 1986 (6).

B), no se han podido reconocer todavía verdaderos linfocitos T aunque sí existen sus funciones (sólo recientemente se han clonado los genes del TcR en trucha), no se les han podido demostrar linfocitos citotóxicos específicos y restringidos por histocompatibilidad, etc. El estado actual de la inmunología de los peces está todavía muy poco desarrollado.

En cuanto a las respuestas humores de peces a los virus que los infectan, donde se han estudiado mayoritariamente es frente a rabdovirus. La dificultad de estimar dichas respuestas estriba en la baja afinidad de la IgM de los peces (28). Los ensayos tradicionales de Ac neutralizantes se han utilizado ampliamente pero con una gran variabilidad. Por ejemplo, sólo el 50% de los peces resistentes a una infección de VHSV exhiben títulos de Ac neutralizantes (82, 98, 100). No obstante se han descrito ELISAs de captura para VSHV (98, 117), para VPC (35), para VNHI (24) e incluso para birnavirus VNPI (34).

La antigenicidad de la G de los rabdovirus de peces no está actualmente tan estudiada como la de la rabia o VSV (25 75). Se han descrito y secuenciado algunos mutantes MAR de VNHI (63) o de VSHV (11, 61) y algunos mapeos de antigenicidad de la G de VNHI utilizando fragmentos recombinantes (60, 75, 94, 130).

En cuanto a las respuestas celulares, se han estudiado mayoritariamente las respuestas de los linfocitos de salmónidos supervivientes a VSHV a la adición de virus inactivados (22), de proteínas virales purificadas (39, 43, 44), de fragmentos recombinantes de la G expresados en *E. coli*, *Y. ruckeri* (una bacteria patógena de trucha) y *S. cerevisiae* (49) y de péptidos sintéticos de la G (81, 83). Dichos estudios han demostrado que cada trucha reacciona de forma individual contra una zona(s) distinta de la pG total y como cabría esperar en una población genéticamente heterogénea. Recientemente, ha sido posible aislar las primeras células dependientes de antígeno (ADC) de peces utilizando un fragmento recombinante de la G de VSHV como antígeno y células adherentes de trucha (33) como presentadoras de dicho fragmento recombinante (40, 41, 45).



Algunas evidencias preliminares muestran correlación entre el reconocimiento por AcM neutralizantes *in vitro* con la capacidad de protección *in vivo* de los fragmentos recombinantes de la G de VNHI (130) o de VSHV (49, 80). Sin embargo, quedan por hacer muchos estudios todavía a causa de la escasez existente de AcM neutralizantes y de los pocos estudios realizados sobre la antigenicidad de la G en otros rhabdovirus de peces.

Métodos de prevención actualmente en estudio. Debido a la falta de vacunas eficaces (75), la lucha contra los rhabdovirus de peces se centra únicamente en controles sanitarios (31). Las medidas sanitarias se basan en la realización de controles periódicos, debiéndose realizar el vacío y la desinfección de las explotaciones en las que se diagnostica la enfermedad.

Durante los últimos 10 años varios laboratorios europeos y americanos han estudiado la posibilidad de inmunizar peces contra el VSHV y el VNHI. Al comprobar que las vacunas vivas atenuadas (desaconsejadas por su posible reversión a la virulencia) y las vacunas de virus inactivados (que sólo confieren protección mediante inyección) no pueden usarse en campo, los intentos actuales se centran en el desarrollo de vacunas por subunidades recombinantes, vacunación DNA o vectores víricos avirulentos (herpes). Otra alternativa es la obtención o desarrollo (peces transgénicos) de líneas de peces genéticamente resistentes a las rhabdovirosis.

Tanto el virión inactivado, como las proteínas G purificadas del VNHI y del VSHV (12) son capaces de proteger contra dosis letales del virus (65). Además los AcM neutralizantes contra el VNHI (38) y contra el VSHV (112, 113) reconocen epítopos localizados en la G (79, 111). Ahora bien, a pesar de los esfuerzos por obtener AcM neutralizantes contra el VHSV sólo se han publicado actualmente 3 AcM, obtenidos en Dinamarca (79, 100), Francia (95) y España (112, 113). Algo similar ocurre en el caso del VNHI (24, 97). Posiblemente, ello es debido a la labilidad del epítopo(s) implicado(s) por ser el epítopo conformacional, tal y como se ha demostrado con el mapeo de mutantes MAR (11, 63) y porque el virus deja de ser infectivo a temperaturas mayores de 14°C.

Aunque la G parece ser el único antígeno vírico capaz de inducir una respuesta de anticuerpos neutralizantes *in vitro* contra el virus, la nucleoproteína N tiene un efecto coadyuvante en protección contra VNHI (97) aunque no contra VSHV (49). Se ha demostrado que la inmunización de truchas con un lisado de *E. coli* expresando una región no glicosilada de la G, es capaz de proteger contra la infección de VNHI (52). Sin embargo, experimentos similares con VSHV han dado resultados negativos en distintos laboratorios (49, 80). Hasta ahora la mejor protección parcial (30-40%) se ha conseguido mediante inmunización con G y N de VSHN obtenidas en levaduras (49) y en células de insecto mediante baculovirus (72). Sin embargo, utilizando baculovirus tanto en VNHI (64) como en VSHV, el nivel de expresión es muy bajo, lo que excluye cualquier aplicación a gran escala (Thiry, Eurogentec, comunicación personal).

También se ha demostrado la viabilidad de la inmunización pasiva como terapia de laboratorio (71) y recientemente se ha demostrado que es posible inducir inmunidad antirhabdovirus de corta duración transmisible de madre a hijos a través de los huevos (103, 105).

La inyección directa de genes y su expresión transitoria en los tejidos del hospedador (vacunas DNA) se ha obtenido ya con varios genes, en varios tejidos y en especies tan diversas, como ratones y peces (29, 54, 77). El potencial de la vacunación DNA como posible vacuna contra la rabia ya se ha demostrado (129) y recientemente se ha comprobado su viabilidad en VNHI (2, 3). Por este método, no se manejan virus vivos, no se necesita ensamblaje de las partículas virales y se permite la selección de péptidos víricos relevantes a la protección por cada individuo (13). Además, este método podría utilizarse simultáneamente con varios virus (121). Aunque los resultados obtenidos hasta el momento son preliminares, su potencial como método futuro de vacunación en Acuicultura (utilizando posiblemente las branquias como órgano diana) es objeto de investigación en varios laboratorios (actualmente existe una red europea en este tema). En un futuro, el éxito de esta técnica puede depender de formulaciones especiales, del estudio de los parámetros que afectan a la especificidad de expresión en distintos tejidos y de la reintroducción en los plásmidos de genes modificadores de respuesta inmunológica (interleukinas, mitógenos, etc.) (108).

La obtención de peces transgénicos (21) es otra de las alternativas que está avanzada en numerosas especies importantes para la Acuicultura, tales como trucha, salmón, tilapia, carpa, pez gato, etc. (1, 19, 20, 32, 58, 87) y en modelos para estudios básicos, tales como medaka, zebrafish, etc., (73, 106). Aunque la idea de introducir genes de resistencia a enfermedades, se ha discutido (53, 87) e incluso se han financiado proyectos de la UE (comunicación personal Dr. Houdebine, Bridge CT89-0267, FAIR CT95-0666) está todavía en desarrollo (118). Las estrategias que se están desarrollando se basan en RNA antisentido, expresión heteróloga de anticuerpos monoclonales neutralizantes, ribozimas específicas o genes víricos de la envuelta que compiten por el receptor viral (20, 87). Actualmente se investiga la utilización de promotores inducibles específicos de tejido (Dr. Pilstrom, comunicación personal) y el promotor CMV (13, 32).

IMPORTANCIA ECONOMICA DE LOS RABDOVIRUS DE PECES

Entre todas las patologías de Acuicultura, entre un 20-40% del tonelaje anual se pierde por rhabdovirosis a nivel mundial (Europa, Estados Unidos y Japón). Ninguna otra patología infecciosa o no, vírica, bacteriana o parasitaria, causa semejantes pérdidas en Acuicultura. No existen vacunas (31, 75), ni métodos terapéuticos para las rhabdovirosis y no es posible o



muy difícil la detección de portadores asintomáticos (74-76). La amenaza de todos los rhabdovirus sobre la producción europea (144000 Tm/año) es tal que se ha puesto en marcha un programa de erradicación en la UE (Doc. 90/495/EF) (55). En España la producción anual de salmónidos ~20.000 Tm/año supone ~100 millones de truchas y una importación anual de 200-400 millones de huevos que entran en España procedentes de otros países sin apenas controles sanitarios. Los estudios básicos sobre los rhabdovirus de peces así como de métodos de prevención y diagnóstico de las rabdovirosis es necesario, ya que los métodos terapéuticos están tecnológicamente lejanos; además ya comienza a ser viable la posibilidad de obtener peces genéticamente resistentes bien por selección genética tradicional (36) o bien por obtención de peces transgénicos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Alvarez, M. C., Martínez, G., and Amores, A. Peces transgénicos en la Acuicultura actual. Actas IV Congreso Nacional Acuicultura. 1993; 4: 245-250.
2. Anderson, E. A. Molecular Marine Biology Biotechnology 1996; 5: 114-122.
3. Anderson, E. A. Molecular Marine Biology Biotechnology 1996; 5: 105-113.
4. Barge, A., Gaudin, Y., Coulon, P. and Ruigrok, R. W. H. Vesicular stomatitis virus M2 protein may be inside the ribonucleocapsid coil. *J Virol* 1993; 67: 7246-7253.
5. Basurco, B. and Benmansour, A. Distant strains of the fish rhabdovirus VHSV maintain a sixth functional cistron which codes for a nonstructural protein of unknown function. *Virology* 1995; 212: 741-745.
6. Basurco, B. and Coll, J. M. Spanish isolates and reference strains of viral haemorrhagic septicaemia virus shown similar protein size patterns. *Bulletin European Association Fish Pathology*. 1989; 9: 92-95.
7. Basurco, B., Sanz, F., Marcotegui, M. A. and Coll, J. M. The free nucleocapsids of the viral haemorrhagic septicaemia virus contain two antigenically related nucleoproteins. *Arch Virol* 1991; 119: 153-163.
8. Basurco, B., Vende P., Monnier, A. F., Winton, J., DeKinkelin, P. and Benmansour, A. Genetic diversity and phylogenetic classification of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV). *Veterinary Research* 1995; 26: 460-463.
9. Basurco, B., Yun, S. and Hedrick, R. P. Comparison of selected strains of infectious necrosis virus (IHNV) using neutralizing trout antisera. *Dis. Aquatic Organ* 1993; 15: 229-233.
10. Baudin, F. L. IHNV in France. *Bulletin European Association Fish Pathology* 1987; 7: 104.
11. Bearzotti, M., Monnier, A. F., Vende, P., Grosclaude, J., DeKinkelin, P., and Benmansour, A. The glycoprotein of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV): antigenicity and role in virulence. *Veterinary Research* 1995; 26: 413-422.
12. Bernard, J., LeBerre, M. B. and DeKinkelin, P. Viral haemorrhagic septicemia of rainbow trout: relation between the G polypeptide and antibody production of fish after infection with the F25 attenuated variant. *Infection Immunity* 1983; 39: 7-14.
13. Betancourt, O. H., Attal, J., Théron, M. C., Puissant, C., and Houdebine, L. M. Efficiency of introns from various origins in fish cells. *Molecular Marine Biology Biotechnology* 1993; 2: 181-188.
14. Bjorklund, H. V., Higman, K. H. and Kurath, G. The glycoprotein genes and gene junctions of the fish rhabdoviruses spring viremia of carp virus and hiram rhabdovirus: analysis of relationships with other rhabdoviruses. *Virus Res* 1996; 42: 65-80.
15. Bovo, G., Giorgetti, G., Jorgensen, P. E. V., and Olesen, N. J. Infectious haematopoietic necrosis: first detection in Italy. *Bulletin European Association Fish Pathology* 1987; 7: 62-63.
16. Brañas, M. V., Coll, J. M. and Estepa, A. A sandwich ELISA to detect and IPNV in turbot. *Aquaculture International* 1994; 2: 206-217.
17. Brunson, R., True, K. and Yancey, J. VHS virus isolated at Makah National Fish Hatchery. *Am. Fish Soc. Fish Health Newsletter* 1989; 17: 3.
18. Castric, J., Jeffroy, J., Bearzotti, M. and DeKinkelin, P. Isolation of viral haemorrhagic septicemia virus (VHSV) from wild elvers *anguilla anguilla*. *Bulletin European Association Fish Pathology* 1992; 12: 21-23.
19. Chatakondi, N., Lovell, R. T., Duncan, P. L., Hayat, M., Chen, T. T., Powers, D. A., Weete, J. D., Cummins, K., and Dunham, R. A. Body composition of transgenic common carp, *Cyprinus carpio*, containing rainbow trout growth hormone gene. *Aquaculture* 1995; 138: 99-109.
20. Chen, T. and Powers, D. A. Transgenic fish. *Trends Biotechnology* 1990; 8: 209-215.
21. Chen, T. T., Lu, J. K., Shamblott, M. J., Cheng, C. M., Lin, C. M., Burns, J. C., Reimschuessel, R., Chatakondi, N., and Dunham, R. A. 1995. Transgenic fish: ideal models for basic research and biotechnological applications. *Zoological Studies* 1995; 34: 215-234.
22. Chilmoneczyk, S. Stimulations spécifiques des lymphocytes de truites arc-en-ciel résistantes à la SHV. *Bull Off Int Epiz* 1977; 87: 395-396.
23. Chilmoneczyk, S., Voccia, I. and Monge, D. Pathogenesis of viral haemorrhagic septicemia virus: cellular aspects. *Veterinary Research* 1995; 26: 505-511.
24. Chou, H. Y., Fukuda, H. and Sano, T. Development of a microplate enzyme immunoassay for the initial screening of monoclonal antibodies against infectious hematopoietic necrosis virus. *Fish Pathol* 1995; 30: 195-199.
25. Coll, J. M. The glycoprotein G of rhabdoviruses. *Arch. Virol.* 1995; 140: 827-851.
26. Coll, J. M. Heptad-repeat sequences in the glycoprotein of rhabdoviruses. *Virus Genes* 1995; 10: 107-114.



27. Coll, J. M. Low-pH increases the binding of haemorrhagic septicemia rhabdovirus to membrane phospholipids. *J Fish Dis* 1996; 18: 519-527.
28. Coll, J. M. and Domínguez-Juncal, J. Applications of monoclonal antibodies in Aquaculture. *Biotechnology Advances* 1995; 13: 45-73.
29. Cox, G. J. M., Zamb, T. J. and Babiuk, L. A. Bovine herpesvirus 1: Immune responses in mice and cattle injected with plasmid DNA. *J Virol* 1993; 67: 5664-5667.
30. DeKinkelin, P. Le virus D'Egtved. II-Purification. *Annals Recherche Vétérinaire* 1972; 3: 199-208.
31. DeKinkelin, P., Bearzotti, M., Castric, J., Nougayrede, P., Lecocq-Xhonneux, F. and Thiry, M. Eighteen years of vaccination against viral haemorrhagic septicemia in France. *Veterinary Research* 1995; 26: 379-387.
32. DelaFuente, J., Martínez, R., Estrada, M. P., Hernández, O., Cabrera, E., García del Barco, D., Lleonart, R., Pimentel, R., Morales, R., Herrera, F., Morales, A., Guillén, I. and Piña, J. C. Towards growth manipulation in tilapia (*Oreochromis* sp.). *Journal Marine Biotechnology* 1995; 3: 216-219.
33. Diago, M. L., López-Fierro, M. P., Razquin, B., Zapata, A. and Villena, A. Cell cultures of stromal cells from the thymus and pronephros of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Phenotypical characterization and hematopoietic capacities. *Dev Comp Immunol* 1991; 15: S1-S61.
34. Dixon, P. F. and Groot, J. Detection of rainbow trout antibodies to infectious pancreatic necrosis virus by an immunoassay. *Dis Aquatic Organ* 1996; 26: 125-132.
35. Dixon, P. F. and Way, H. K. Detection of carp antibodies to spring viraemia of carp virus by a competitive immunoassay. *Dis Aquatic Organ* 1994; 19: 181-186.
36. Dorson, M., Quillet, E., Hollebecq, M. G., Torhy, C. and Chevassus, B. Selection of rainbow trout resistant to viral haemorrhagic septicemia virus and transmission of resistance by gynogenesis. *Veterinary Research* 1995; 26: 361-368.
37. Durrer, P., Gaudin, Y., Ruigrok, R. W. H., Graf, R. and Brunner, J. Photolabeling identifies a putative fusion domain in the envelope glycoprotein of rabies and vesicular stomatitis viruses. *J Biol Chem* 1995; 270: 17575-17581.
38. Engelking, H., and Leong, J. C. The glycoprotein of Infectious Hematopoietic Necrosis Virus eliciting antibody and protective responses. *Virus Res* 1989; 13: 213-230.
39. Estepa, A. 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*: 1992: 243.
40. Estepa, A., Alvarez, F., Ezquerro, A. and Coll, J. M. Trout antigen-dependent cells from survivors of rhabdoviral infection show T-cell characteristics. *Virology* submitted: 1996.
41. Estepa, A., Alvarez, F., Villena, A. and Coll, J. M. Morphology of antigen-dependent haematopoietic cells from trout surviving rhabdoviral infections. *Bull Eur Ass Fish Pathol* 1996; 16: 203-207.
42. Estepa, A., Basurco, B., Sanz, F. and Coll, J. M. Stimulation of adherent cells by the addition of purified proteins of viral haemorrhagic septicaemia virus to trout kidney cell cultures. *Viral Immunol* 1991; 4: 43-52.
43. Estepa, A. and Coll, J. M. 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* 1992; 2: 53-68.
44. Estepa, A. and Coll, J. M. Replication of rhabdovirus in trout hematopoietic cells. *Investigaciones Agrarias* 1994; 9: 37-44.
45. Estepa, A. and Coll, J. M. A method to obtain trout T-like cells in vitro. *J Immunol Methods* submitted: 1996.
46. Estepa, A. and Coll, J. M. Pepsam mapping and fusion related properties of the major phosphatidylserine-binding domain of the glycoprotein of viral hemorrhagic septicemia virus, a salmonid rhabdovirus. *Virology* 1996; 216: 60-70.
47. Estepa, A. and Coll, J. M. Phosphatidylserine binding to solid-phase peptides: a new methods to study phospholipid/viral protein interactions. *J Virol Methods* 1996; 61: 37-45.
48. Estepa, A., DeBlas, C., Ponz, F. and Coll, J. M. Diagnosis of trout haemorrhagic septicemia rhabdovirus by capture with monoclonal antibodies and amplification with PCR. *Veterinary Research* 1995; 26: 530-532.
49. Estepa, A., Thiry, M. and Coll, J. M. Recombinant protein fragments from haemorrhagic septicaemia rhabdovirus stimulate trout leucocyte anamnestic in vitro responses. *J Gen Virol* 1994; 75: 1329-1338.
50. Frerichs, G. N. Rhabdoviruses of fishes. Viruses of lower vertebrates. Ahne, W. & Kurstak, E. eds. *Springer*, Berlin. 1989; 1: 27-32.
51. Frerichs, G. N., Rodger, H. D. and Peric, Z. Cell culture isolation of piscine neuropathy nodavirus from juvenile sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *J Gen Virol* 1996; 77: 2067-2071.
52. Gilmore, R. D. J., Engelking, H. M., Manning, D. S. and Leong, J. C. Expression in *Escherichia coli* of an epitope of the glycoprotein of infectious haematopoietic necrosis virus protects against challenge. *Biotechnology* 1988; 6: 295-300.
53. Gong, Z. and Hew, C. L. Transgenic fish in Aquaculture and developmental biology. Current Topics in Developmental Biology. ed. Pedersen, R. A. and Schatten, G. P. *Academic Press* 1995; 30: 176-214.
54. Hansen, E., Fernandes, K., Goldspink, G., Buterworth, P., Umeda, P. K. and Chang, K. C. Strong expression of foreign genes following direct injection into fish muscle. *FEBS Lett* 1991; 290: 73-76.
55. Hattenberg-Baudoy, A. M., Danton, M., Merle, G. and DeKinkelin, P. Serum neutralization test for epidemiological studies of salmonid rhabdoviruses in France. *Veterinary Research* 1995; 26: 512-520.
56. Hedrick, R. P., LaPatra, S. E., Yun, S., Lauda, K. A., Jones, G. R., Congleton, J. L. and DeKinkelin, P. Induction of protection from infectious hematopoietic necrosis virus in



rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* by pre-exposure to the avirulent cutthroat trout virus (CTV). *Dis Aquatic Organ* 1994; 20: 111-118.

57. Helmick, C. M., Bailey, J. F., LaPatra, S. and Ristow, S. The esophagus/cardiac stomach region: site of attachment and internalization of infectious hematopoietic necrosis virus in challenged juvenile rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* and coho salmon *O kisutch*. *Dis Aquatic Organ* 1995; 23: 189-199.

58. Hew, C. L., Fletcher, G. L. and Davies, P. L. Transgenic salmon: Tailoring the genome for food production. *Journal Fish Biology* 1995; 47: 1-19.

59. Hopper, K. The isolation of VHSV from salmon at Glenwood Springs, Orcas Island, Washington. *Am Fish Soc Fish Health Newsletter* 1989; 17: 1.

60. Huang, C. Ph. D. Thesis. University of Washington, Seattle. 1993.

61. Jorgensen, P. E. V., Einer-Jensen, K., Higman, K. H. and Winton, J. R. Sequence comparison of the central region of the glycoprotein gene of neutralizable, non-neutralizable, and serially passed isolates of viral haemorrhagic septicemia virus. *Dis Aquatic Organ* 1995; 23: 77-82.

62. Kazmierski, W. M., Hazen, R. J., Aulabaugh, A. and StClair, H. Inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 derived from gp41 transmembrane protein: structure-activity studies. *Journal Medical Chemistry* 1996; 39: 2681-2689.

63. Kim, C. H., Winton, J. R. and Leong, J. C. Neutralization-resistant variants of infectious hematopoietic virus have altered virulence and tissue tropism. *J Virol* 1994; 68: 8447-8453.

64. Koener, J. F. and Leong, J. C. Expression of the glycoprotein gene from a fish rhabdovirus by using baculovirus vectors. *J Virol* 1990; 64: 428-430.

65. Koener, J. F., Passavant, C. W., Kurath, G. and Leong, J. Nucleotide sequence of a cDNA clone carrying the glycoprotein gene of Infectious Haematopoietic Necrosis virus, a fish rhabdovirus. *J Virol* 1987; 61: 1342-1349.

66. Kurath, G., Ahern, K. G., Pearson, G. D. and Jeong, J. C. Molecular cloning of the six mRNA species of infectious hematopoietic necrosis virus, a fish rhabdovirus, and gene order determination by R-loop mapping. *J Virol* 1985; 53: 469-476.

67. Kurath, G., Higman, K. H. and Bjorklund, H. V. The NV genes of fish rhabdoviruses: development of RNase protection assays for rapid assessment of genetic variation. *Veterinary Research* 1995; 26: 477-485.

68. Lambert, D. M., Barney, S., Lambert, A. L., Guthrie, K., Medinas, R., Davis, D. E., Bucy, T., Erickson, J., Merutka, G., and Petteway, S. R. Peptides from conserved regions of paramyxovirus fusion (F) proteins are potent inhibitors of viral fusion. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 2186-2191.

69. LaPatra, S. E., Lauda, K. A. and Jones, G. R. Antigenic variants of infectious hematopoietic necrosis virus and implications for vaccine development. *Dis Aquatic Organ* 1994; 20: 119-126.

70. LaPatra, S. E., Lauda, K. A. and Jones, G. R. Aquareo-virus interference mediated resistance to infectious hematopoietic necrosis virus. *Veterinary Research* 1995; 26: 455-459.

71. LaPatra, S. E., Lauda, K. A., Jones, G. R., Walker, S. C. and Shewmaker, W. D. Development of passive immunotherapy for control of infectious hematopoietic necrosis. *Dis Aquatic Organ* 1994; 20: 1-6.

72. Lecocq-Xhonneux, F., Thiry, M., Dheur, I., Rossius, M., Vanderheijden, N., Martial, J. and DeKinkelin, P. A recombinant viral haemorrhagic septicemia virus glycoprotein expressed in insect cells induces protective immunity in rainbow trout. *J Gen Virol* 1994; 75: 1579-1587.

73. Lele, Z. and Krone, P. H. The zebra fish as a model system in developmental, toxicological and transgenic research. *Biotechnology Advances* 1996; 14: 57-72.

74. Leong, J. A. and Munn, C. B. Potential uses of recombinant DNA in development of fish vaccines. *Bulletin European Association Fish Pathology* 1991; 11: 30-40.

75. Leong, J. C., Bootland, L., Anderson, E., Chiou, P. W., Drolet, B., Kim, C., Lorz, H., Mourich, D., Ormonde, P., Pérez, L. and Trobridge, G. Viral vaccines for aquaculture. *Journal Marine Biotechnology* 1995; 3: 16-23.

76. Leong, J. C. and Fryer, J. L. Viral vaccines for aquaculture. *Ann Rev Fish Dis* 1993; 225-240.

77. Liu, M. A., Hilleman, M. R. and Kurth, R. DNA vaccines. A new era in vaccinology. *Annals New York Academy Sciences* 1995; 772: 1-294.

78. Lorenzen, N. and Olesen, N. J. Multiplication of VHS virus in insect cells. *Veterinary Research* 1995; 26: 428-432.

79. Lorenzen, N., Olesen, N. J. and Vestergaard-Jorgensen, P. E. Neutralization of Egtved virus pathogenicity to cell cultures and fish by monoclonal antibodies to the viral G protein. *J Gen Virol* 1990; 71: 561-567.

80. Lorenzen, N., Olesen, N. J., Vestergaard-Jorgensen, P. E., Etzerodt, M., Holtet, T. L. and Thorgensen, M. C. 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* 1993; 74: 623-630.

81. Lorenzo, G., Estepa, A., Chilmonczyk, S. and Coll, J. M. Mapping of the G and N regions of viral haemorrhagic septicemia virus (VHSV) inducing lymphoproliferation by pepsin. *Veterinary Research* 1995; 26: 521-525.

82. Lorenzo, G., Estepa, A. and Coll, J. M. Fast neutralization/immunoperoxidase assay for viral haemorrhagic septicemia with anti-nucleoprotein monoclonal antibody. *J Virol Methods* 1996; 58: 1-6.

83. Lorenzo, G. A., Estepa, A., Chilmonczyk, S. and Coll, J. M. Different peptides from haemorrhagic septicemia rhabdoviral proteins stimulate leucocyte proliferation with individual fish variation. *Virology* 1995; 212: 348-355.

84. Lu, Y. and Loh, P. C. Viral structural proteins and genome analysis of the rhabdovirus of penaeid shrimp (RPS). *Dis Aquatic Organ* 1994; 19: 187-192.



85. Lu, Y., Loh, P. C. and Nadala, E. C.B. Serological studies of the rhabdovirus affecting carps in Spain. *Bulletin European Association Fish Pathology* 1992; 12: 50-52.
86. Martínez, G., Alvarez, M. C. and Amores A. Ultimas tendencias de la aplicación de la genética al cultivo de peces. *Actas V Congreso Nacional de Acuicultura* 1995; 5: 10-17.
87. McAllister, E. Infecciones víricas de peces cultivados. *Patología en Acuicultura*. J. Espinosa de los Monteros y U. Labarta, eds. *CAICYT* 1988; 1: 37-214.
88. McAllister, P. E. and Owens, W. J. Identification of the three serotypes of Viral Haemorrhagic Septicemia Virus by immunoblot assay using antiserum to serotype F1. *Bull Eur Ass Fish Pathol* 1987; 7: 90-91.
90. McAllister, P. E., Schill, W. B., Owens, W. J. and Hodge, D. L. Infectious pancreatic necrosis virus: a comparison of methods used to detect and identify virus in fluids and tissues of fish. In proceedings of II International Symposium on Viruses of Lower Vertebrates. Oregon State University. Corvallis, Oregon, USA. 1991; 191-201.
91. Mebatsion, T., König, M. and Conzelmann, K. K. Budding of rabies virus particles in the absence of the spike protein. *Cell* 1996; 84: 941-951.
92. Mebatsion, T., Schnell, M. J., Cox, J. H., Finke, S. and Conzelmann, K. K. Highly stable expression of a foreign gene from rabies virus vectors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996; 93: 7310-7314.
93. Morzunov, S. P., Winton, J. R. and Nichol, S. T. The complete genome structure and phylogenetic relationship of infectious hematopoietic necrosis virus. *Virus Res* 1995; 38: 175-192.
94. Mourich, D. V. and Leong, J. C. Mapping of the immunogenic regions of the IHNV glycoprotein in rainbow trout and mice. Proceedings second international symposium on viruses of lower vertebrates. Oregon State University. Oregon, USA. July 1991; 29-31: 93-100.
95. Mourton, C., Bearzotti, M., Piechaczyk, M., Paolucci, F., Pau, B., Bastide, J. M. and Kinkelin, P. D. Antigen-capture ELISA for viral haemorrhagic septicaemia virus serotype I. *J Virol Methods* 1990; 29: 325-334.
96. Nichol, S. T., Rowe, J. E. and Winton, J. R. Molecular epizootiology and evolution of the glycoprotein and non-virion protein genes of infectious hematopoietic necrosis virus, a fish rhabdovirus. *Virus Res* 1995; 38: 159-173.
97. Oberg, L. A., Wirkkula, J., Mourich, D. and Leong, J. C. Bacterially expressed nucleoprotein of infectious haematopoietic necrosis virus augments protective immunity induced by the glycoprotein vaccine in fish. *J Virol* 1991; 65: 4486-4489.
98. Olesen, N. J., Lorenzen, N. and Vestergaard-Jorgensen, P. E. Detection of rainbow trout antibody to Egtved virus enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), immunofluorescence (IF), and plaque neutralization tests (50% PNT). *Dis Aquatic Organ* 1991; 10: 31-38.
99. Olesen, N. J., Lorenzen, N. and Jorgensen, P. E. V. Serological differences among isolates of viral haemorrhagic septicemia virus detected by neutralizing monoclonal and polyclonal antibodies. *Dis Aquatic Organ* 1993; 16: 163-170.
100. Olesen, N. J. and Vestegard-Jorgensen, P. E. Detection of neutralizing antibody to Egtved virus in Rainbow trout (*Salmo gairdneri*) by plaque neutralization test with complement addition. *J Appl Ichthyol* 1986; 2: 33-41.
101. Oshima, K. H., Arakawa, C. K., Higman, K. H., Landolt, M. L., Nichol, S. T. and Winton, J. R. The genetic diversity and epizootiology of infectious hematopoietic necrosis virus. *Virus Res* 1995; 35: 123-141.
102. Oshima, K. H., Higman, K. H., Arakawa, C. K., DeKinkelin, P., Jorgensen, P. E. V., Meyers, T. R. and Winton, J. R. Genetic comparison of viral hemorrhagic septicemia virus isolates from North America and Europe. *Dis Aquatic Organ* 1993; 17: 73-80.
103. Oshima, S., Hata, J., Segawa, C. and Yamashita, S. Mother to fry, successful transfer of immunity against infectious haematopoietic necrosis virus infection in rainbow trout. *J. Gen. Virol.* 1996; 77: 2441-2445.
104. Pinto, R. M. Infección eritrocítica vírica en la lubina (*dicentrarchus labrax*). PhD Tesis. Dpto. Microbiología. Univ. Barcelona. 1990: 1-236.
105. Pinto, R. M., Jofre, J., Abad, J. F., González-Dankaart, J. F. and Bosch, A. Concentration of fish enveloped viruses from large volumes of water. *J Virol Methods* 1993; 43: 31-40.
106. Powers, D. A. Fish a model systems. *Science* 1989; 240: 352-358.
107. Rabenstein, M. and Shin, Y. K. A peptide from the heptad repeat of human immunodeficiency virus gp41 shows both membrane binding and coiled-coil formation. *Biochemistry* 1995; 34: 13390-13397.
108. Raz, E., Watanabe, A., Baird, S. M., Eisenberg, R. A., Parr, T. B., Lotz, M., Kipps, T. J. and Carson, D. A. Systemic immunological effects of cytokine genes injected into skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 4523-4527.
109. Rodríguez, S., Vilas, M. P., Alonso, M. and Pérez, S. I. Study of a viral-dual infection in rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*) by seroneutralization, Western blot and polymerase chain reaction assays. *Microbiologia Sem* 1995; 11: 461-470.
110. Ross, K., McCarthy, U., Huntly, P. J., Wood, B. P., Stuart, D., Rough, E. I., Smail, D. A., and Bruno, D. W. An outbreak of viral haemorrhagic septicemia (VHS) in turbot (*Scophthalmus maximus*) in Scotland. *Bulletin European Association Fish Pathology* 1994; 14: 213-214.
111. Sanz, F., Basurco, B., Babin, M., Domínguez, J. and Coll, J. M. Monoclonal antibodies against the structural proteins of viral haemorrhagic septicaemia virus isolates. *J Fish Dis* 1993; 16: 53-63.



112. Sanz, F. and Coll, J. M. Techniques for the diagnosis of the viral diseases of salmonids. *Dis Aquatic Organ* 1992; 13: 211-223.
113. Sanz, F. A. and Coll, J. M. 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* 1992; 53: 897-903.
114. Schlotfeldt, H. J., Ahne, W., Vestergard-Jorgensen, P. E. and Glende, W. Occurrence of viral haemorrhagic septicaemia in turbot (*Scophthalmus maximus*)-A natural outbreak. *Bulletin European Association Fish Pathology* 1991; 11: 105-107.
115. Schnell, M. J., Mebatsion, T. and Conzelmann, K. K. Infectious rabies viruses from cloned cDNA. *EMBO Journal* 1994; 13: 4195-4203.
116. Schutze, H., Enzmann, P. J., Kuchling, R., Mundt, E., Niemann, N. and Mettenleiter, T. C. Complete genomic sequence of the fish rhabdovirus infectious haematopoietic necrosis virus. *J Gen Virol* 1995; 76: 2519-2527.
117. Thuvander, A., Fossum, C. and Lorenzen, N. Monoclonal antibodies to salmonid immunoglobulin: characterization and applicability in immunoassays. *Dev Comp Immunol* 1990; 14: 415-423.
118. Timmusk, S., Bengten, E., Lundquist, M., Stromberg, S. and Pilstrom, L. Expression of different immunoglobulin genes in transgenic trout (*Oncorhynchus mykiss*). A preliminary report. Consolidated progress report «Fish protection in aquaculture: improvement of fish vaccine efficacy by studying stimulation of the fish immune response (Contract n.º AIR2-CT94-1334). 1995; 1: 123-128.
119. Vilas, M. P., Rodríguez, S. and Pérez, S. A case of coinfection of IPN and IHN virus in farmed rainbow trout in Spain. *Bulletin European Association Fish Pathology* 1994; 14: 47-50.
120. Whelan, P. J., Ball, L. A., Barr, J. N. and Wertz, G. T. W. Efficient recovery of infectious vesicular stomatitis virus entirely from cDNA clones. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 8388-8392.
121. Whintton, J. L., Sheng, N., Oldstone, M. B. A. and McKee, T. A. A «String-of-Beads» vaccine, comprising linked minigenes, confers protection from lethal-dose virus challenge. *J Virol* 1993; 67: 348-352.
122. Winton, J., Batts, W., Deering, R., Brunson, R., Hopper, K., Nishizawa, T. and Stehr, C. Characteristics of the first North American isolations of viral hemorrhagic septicaemia virus. Proceedings second international symposium on viruses of lower vertebrates. Oregon State Univ. Press. Corvallis. 1991; 1: 43-50.
123. Winton, J. R. Recent advances in detection control of infectious hematopoietic necrosis virus in Aquaculture. *Ann. Rev Fish Dis* 1991; 1: 83-93.
124. Wolf, F. and Quimby, M. C. Established eurythermic line of fish cells in vitro. *Science*. 1962; 135: 1065-1066.
125. Wolf, K. and Mann, J. A. Poikilothermic vertebrate cell lines and viruses. A current listing for species. *In Vitro*. 1980; 16: 168-169.
126. Wolf, K. and Quimby, M. C. Lymphocystis virus: isolation and propagation in centrarchid fish cell lines. *Science*. 1966; 151: 1004-1005.
127. Wolf, K., Quimby, M. C., Pettijohn, L. L. and Landolt, M. L. Fish viruses: isolation and identification of infectious hematopoietic necrosis virus in Eastern North America. *Journal Fish Research* 1973; 30: 1625-1627.
128. Wunner, W. H., Calisher, C. H., Dietzgen, R. G., Jackson, A. D., Ritajima, E. W., Lafon, M., Leong, J. C., Nichol, S. T., Peters, D., Smith, J. S. and Walker, P. J. Rhabdoviridae. Classification and nomenclature of viruses. Sixth Report International Committee on Taxonomy of viruses. 1995; 6: 1-158.
129. Xiang, Z. Q., Spitalnik, S., Tran, M., Wunner, W. H., Cheng, J. and Ertl, H. C. J. Vaccination with a plasmid vector carrying the rabies virus glycoprotein gene induces protective immunity against rabies virus. *Virology*. 1994; 199: 132-140.
130. Xu, L., Mourich, D. V., Engelkin, H. M., Ristow, S., Arnzen, J. and Leong, J. C. Epitope mapping and characterization of the infectious hematopoietic necrosis virus glycoprotein, using fusion proteins synthesized in *Escherichia coli*. *J Virol* 1991; 65: 1611-1615.
131. Yao, Q. and Compans, R. W. Peptides corresponding to the heptad repeat sequence of human parainfluenza virus fusion protein are potent inhibitors of virus infection. *Virology*. 1996; 223: 103-112.
132. Zhang, H. G. and Hanson, L. A. Recombinant channel catfish virus (Ictalurid herpesvirus 1) can express foreign genes and induce antibody production against the gene product. *J Fish Dis* 1996; 19: 121-128.