

APLICACION DE RABDOVIRUS DNA INFECTIVO PARA EL DESARROLLO DE UN NUEVO VECTOR PARA TRATAR ICTIOPATOLOGIAS INFECCIOSAS

A. ESTEPA

Universidad Miguel Hernández, Elche, Alicante

M. BREMONT

INRA, Institute National Recherche Agronomique, Juoy-en-Josas, Francia

M. FERNANDEZ-ALONSO

J.M. COLL

INIA - CISA, Centro Investigación Sanidad Animal, Valdeolmos, Madrid

RESUMEN

La reciente elucidación de la secuencia completa del genoma RNA negativo (~12 Kb) del rhabdovirus de la necrosis hematopoiética infecciosa (NHI) de salmónidos y el desarrollo de métodos que permiten el rescate de virus infectivos a partir de cDNA tanto en los rhabdovirus de la rabia como en el de la estomatitis vesicular (EV), ha puesto al alcance de la mano la posibilidad de obtener rhabdovirus de peces a partir de cDNA infectivo. Se abren con ello importantes posibilidades de manipulación de estos genomas RNA hasta ahora imposibles. Dicha manipulación puede hacerse con el objetivo de obtener virus mutantes de bajas probabilidades de reversión que pudieran utilizarse como vacunas. Otra posibilidad es la de diseñar rhabdovirus NHI heterólogos que expresaran las proteínas G de otros rhabdovirus (septicemia hemorrágica vírica, SHV, viremia primaveral de la carpa, VPC, etc.) (proyecto UE FAIR CT98-4398). Además sería posible clonar cualquier otra proteína vírica o bacteriana en rhabdovirus DNA infectivos. Su uso potencial como vectores aumenta el ámbito de la posible aplicación de rhabdovirus DNA infectivos para controlar las enfermedades en Acuicultura.

PALABRAS CLAVE: Rhabdovirus DNA infectivos
Acuicultura

TENDENCIAS ACTUALES EN VACUNAS DE PECES

A pesar de los numerosos trabajos en Ictiopatología, las vacunas para peces son uno de los temas que están poco desarrollados. Excepto para unas pocas enfermedades bacterianas (boca roja y vibriosis, por ejemplo), el desarrollo de vacunas para peces ha tropezado con numerosos problemas. Después del fracaso de las vacunas muertas convencionales y de los pocos éxitos conseguidos con vacunas no replicativas basadas en proteínas recombinantes, actualmente todavía se buscan nuevos vectores para el transporte de los genes adecuados al desarrollo de vacunas para la mayoría de las enfermedades en Acuicultura. Entre los nuevos vectores en desarrollo están las vacunas DNA (Fernandez-Alonso, 1998) y la utiliza-

Recibido: 10-7-98

Aceptado para su publicación: 21-6-99

ción de algunos virus como vectores. Entre estos últimos los rabdovirus de peces ofrecen una posibilidad atractiva debido a su capacidad de infección y replicación en estos animales sin embargo para su utilización como posibles vectores habría que convertirlos en genomas DNA puesto que al ser virus RNA no se pueden manipular fácilmente por métodos de ingeniería genética (mutagénesis dirigida, por ejemplo). La complejidad del problema se ve aumentada al ser los rabdovirus virus RNA negativos incapaces de sintetizar sus proteínas sin antes producir una cadena complementaria de RNA positivo. Por ello precisan de un complejo viral proteico (la nucleocapsida) para iniciar su traducción.

IMPORTANCIA DE LOS RABDOVIRUS DE PECES

De todos los virus de peces actualmente conocidos, los rabdovirus (Leong *et al.*, 1995) junto con los birnavirus (McAllister *et al.*, 1991) constituyen el grupo más numeroso. De estos dos grupos, los rabdovirus tienen una incidencia económica de mayor amplitud porque causan altas mortalidades en adultos en las explotaciones piscícolas de todo el mundo. Aunque ya se han descrito más de 20 tipos de rabdovirus de peces que afectan a otras tantas especies, 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 1) (Frerichs, 1989). Entre los rabdovirus 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 Primavera de la Carpa (VPC). Estos tres virus destacan por que son los que actualmente causan mayores pérdidas económicas en Acuicultura.

El virus de la SHV, también llamado virus de Egtved, es endémico en Europa y afecta a varias especies. Se han demostrado infecciones experimentales en la lubina y el rodaballo (Brañas *et al.*, 1994), y se ha aislado en cultivos de las especies: rodaballo (Schlotfeldt *et al.*, 1991), anguila, lenguado y langostino (Liu *et al.*, 1995). Recientemente también se ha aislado en Norteamérica a partir de salmón, bacalao y arenque (Brunson *et al.*, 1989; Hopper, 1989; Winton *et al.*, 1991). Se conocen cuatro serotipos, siendo el serotipo 1 el más difundido (McAllister y Owens, 1987; Olesen *et al.*, 1993). En España, el INIA aisló e identificó siete brotes de esta enfermedad de los que se han caracterizado cinco (Basurco y Coll, 1989). Desde 1987 no se han vuelto a aislar brotes de este virus. El VSHV (DeKinkelin, 1972) originario de Europa es similar al VNHI (Koener *et al.*, 1987) originario de Norteamérica, pero no tienen reacciones cruzadas de seroneutralización. Hace pocos años se detectó por primera vez VNHI en Francia (Baudin, 1987) y en Italia (Bovo *et al.*, 1987). En 1991 se detectó en los Pirineos franceses (J. Adroit, O.I.E. 1991) y en 1993 en España hubo algún brote en coinfección con birnavirus (Rodríguez *et al.*, 1995; Vilas *et al.*, 1994).

OBTENCION DE RABDOVIRUS RNA NEGATIVO A PARTIR DE DNAs INFECTIVOS

En el proceso de infección natural para reproducir virus RNA negativos infectivos se necesitan tanto la replicación de su RNA genómico negativo (-) por polimerasas RNA dependientes de RNA (polimerasas virales incluidas en la nucleocapsida) a través de

TABLA 1
RABDOVIRUS DE PECES

Fish rhabdoviruses

Virus	Origen	Tamaño (nm)	Temp. °C	Células
VHSV Viral haemorrhagic septicaemia	Trucha Arco iris Salmo Gairdneri	198x68	6-18	R,F,E,C
IHN Infectious haematopoietic necrosis	Salmón Sockeye Oncorhynchus nerka	156x82	13-18	R,F,E,C
SVC Spring viraemia carp	Carpa común Cyprinus carpio	140x77	4-32	R,F,E,C
PFRV Pike Fry rhabdo	Tenca Exos lucius	125x80	21-28	R,F,E
EVA Eel Virus A	Anguila americana Anguilla rostrata	134x79	10-29	R,F,E,B
EVX Eel Virus Europe X	Anguila europea Anguilla anguilla	134x79	10-29	R,F,E,B
CUSR Cod ulcer-syndrome rhabdo	Bacalao Atlantico Gadus morhua	155x65	14-16	PS (R,F,B)
RGPR Rio Grande Perca rhabdo	Perca del Rio Grande Cichlasoma cyanogutatum	—	23-33	R,F,B
EV Eel Virus B ₁₂	Anguila europea Anguilla anguilla	185x75	10-20	E (R)
RS Rhabdovirus salmonis	Trucha Arco iris Salmo gairdneri	135x65	18-20	R,F,E
PR Perch rhabdovirus	Perca Perca fluviatilis	200x100	13-15	R (E)
HRV Hirame rhabdovirus (R. olivaceus)	Platija Japonesa Paralichthys olivaceus	190x80	5-20	R,F,E,B (C)
VDRV Ulcerative disease rhabdo	Striped snakehead Ophicephalus striatus	120x80	25-30	B (C,E)

Según datos recopilados por Frerichs, 1989. Líneas celulares que son susceptibles sin paréntesis, las que son refractarias entre paréntesis. R = RTG-2. E = EPC. F = FHM. C = CHSE. B = BF-2.

According to data from Frerichs, 1989. Susceptible cell lines not in between parenthesis, resistant in between parenthesis. R = RTG-2. E = EPC. F = FHM. C = CHSE. B = BF-2.

intermediarios RNA +/-, como la producción por las mismas polimerasas de RNA+ monocistrónicos como mensajeros (RNAm) para traducir cada una de las proteínas víricas (Fig. 1).

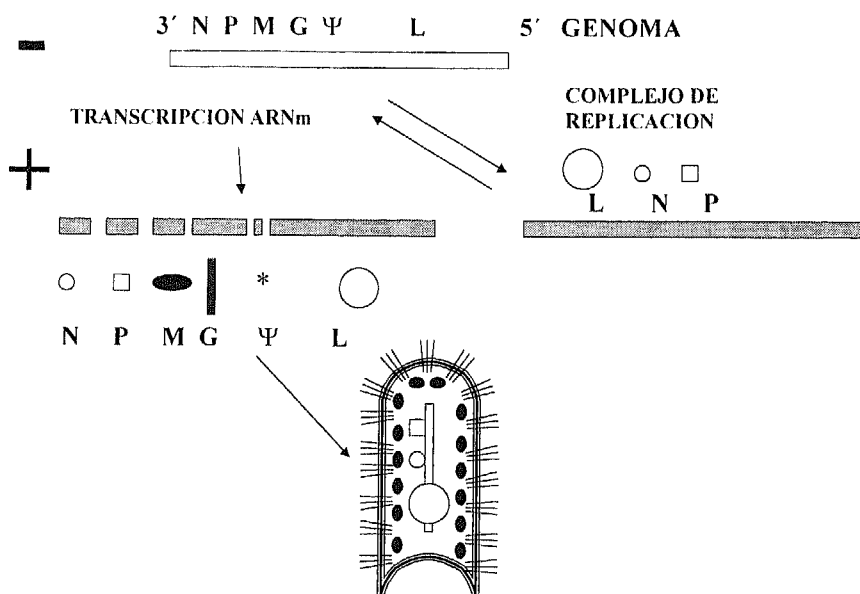


Fig. 1.—Esquema de la replicación del rabdovirus NHI. El genoma RNA negativo de 12 Kb (seis proteínas) del NHI sirve de molde para la replicación del RNA de banda positiva y negativa (+/-) y la transcripción de seis mRNA+ monocistrónicos. Para que el genoma RNA- se replique y se transcriba se necesitan la presencia de las proteínas víricas N (nucleocápsida), P (fosfoproteína) y L (polimerasa RNA dependiente de RNA).

Scheme of IHN rhabdoviral replication. The negative RNA genome of about 12 Kb (six proteins) serves for replication of positive and negative RNA (+/-) and for transcription of six monocistronic mRNA+. In order to replicate and transcribe the RNA-, the presence of the viral proteins N (nucleocapsid), P (phosphoprotein) and L (polymerase) are needed.

La producción de genomas víricos RNA a través de DNA infectivo requiere polimerasas RNA dependientes de DNA, por lo que depende de la capacidad de dichas polimerasas para transcribir el RNA de forma que luego sea aceptado por las polimerasas RNA dependientes de RNA (polimerasas víricas) (Whelan *et al.*, 1995). Los RNA genómicos transcritos por polimerasas RNA dependientes de DNA (por ejemplo, las del fago T7) si que son aceptados por las polimerasas RNA dependientes de RNA víricas de los virus RNA+ pero no por las de los virus RNA- (tales como los RNA- de los rabdovirus). Además mientras que los RNA+ sirven para traducir las proteínas que codifican, los RNA- necesitan de su transcripción a RNA+ antes de poder ser traducidos a proteínas. Por otra parte, los RNA-genómicos completos, así como sus correspondientes RNA+ completos (policistrónicos) producidos por polimerasas RNA dependientes de DNA pueden no ser funcionales como RNA mensajeros, por ejemplo, porque se requiera su transcripción a RNA mensajeros monocistrónicos (caso de los rabdovirus).

Debido a los fenómenos descritos arriba, en el caso de los virus RNA-, todas las proteínas víricas (N,P,L) que forman en la nucleocapsida de estos virus el molde correcto para replicación y transcripción del RNA deben suministrarse junto con el genoma DNA completo para poder obtener virus infecciosos a partir de DNA infectivo. Las proteínas víricas se suministran en forma de plásmidos codificando sus genes bajo el control del promotor de la polimerasa del fago T7 (Fig.2).

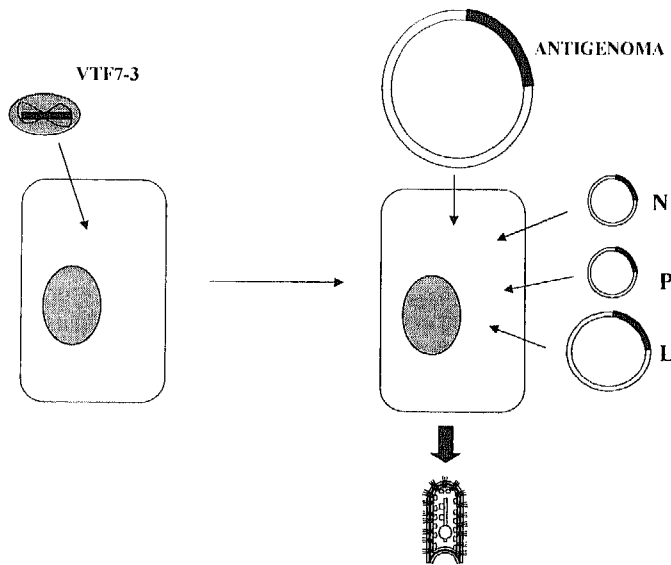


Fig. 2.—Diseño utilizado para obtener los rhabdovirus de rabia y de VEV a partir de DNA infectivo. Se han utilizado plásmidos independientes que contienen el genoma rhabdoviral y cada una de las proteínas rhabdovirales N, P y L, bajo el control del promotor de la polimerasa RNA dependiente de DNA del fago T7 (O). Dicha polimerasa la pueden aportar células transformadas permanentemente, o bien, células infectadas con virus vacuna que llevan su gen (VTF7-3). La transfección de dichas células con los plásmidos anteriormente citados son capaces de producir rhabdovirus infeccioso que aunque con poca eficiencia (10^5 virus/ 10^6 células (Whelan et al., 1995) pueden ser después amplificados en cultivo celular. De esta manera se abre la posibilidad de manipular el genoma RNA- de los rhabdovirus tanto para estudiar sus mecanismos de replicación, como para su atenuación de cara a la obtención de vacunas y su uso como vectores.

Design used to obtain the rhabdoviruses of rabies and of VSV with infective DNA. Four independent plasmids containing the whole rhabdoviral genome and each of the viral proteins N, P and L, under the control of the promotor of the DNA dependent RNA polymerase of phage T7 (O). That polymerase can be obtained by cells permanently transformed or by vaccinia (VTF7-3) infected cells. The transfection of those cells with the above mentioned plasmids are able to produce infective rhabdovirus which although with low efficiency 10^5 virus/ 10^6 células (Whelan et al., 1995) can be latter amplified in cell culture. In this way, the possibility of manipulating the RNA- of the rhabdovirus is open to study the replication mechanisms and also for its atenuation for vaccine design and use as a vector.

Sólo se han podido conseguir rhabdovirus RNA- utilizando DNA infectivo que transcribiera RNA+ (antigenómico). Ello parece ser debido a que la polimerasa RNA dependiente de DNA (polimerasa T7 que se utiliza en estos métodos) termina la transcripción a RNA- al llegar a las regiones intergénicas, tal y cómo se ha demostrado en VEV (Whelan

et al., 1995). Estos transcritos incompletos no solamente no pueden replicarse por no tener el origen 3', sino que además pueden inhibir la traducción por hibridación con los transcritos de los plásmidos codificadores de las proteínas N, P, y L.

APLICACIONES DE LOS RABDOVIRUS DNA INFECTIVOS

Una primera aplicación de los rabdovirus DNA infectivos es la posibilidad de generación de mutantes para diseñar virus de bajo porcentaje de reversión para utilización como vacunas. Utilizando PCR es posible realizar fácilmente mutagénesis dirigida en varios puntos del genoma. Se generan así mutantes que afectan a varias posiciones y que tienen un índice de reversión a la virulencia muy por debajo de los mutantes tradicionales. Los mutantes en el gen de la proteína G se pueden después incorporar al DNA infectivo por manipulaciones de ingeniería genética y poder así recuperarlos en el virión.

Otra aplicación importante de esta tecnología ha sido el desarrollo de los rabdovirus como vectores para la expresión de genes extraños, tal y como ha sido demostrado con la rabia utilizando un gen marcador. Parece posible que con el desarrollo de esta tecnología se puedan desarrollar vectores rabdovirales que solo puedan transcribir (generando antígenos víricos de interés) pero no replicar (controlando su difusión), lo cual sería de una mayor seguridad. Alternativamente y por manipulación de los genes codificadores de las proteínas M y G, debería ser posible generar vectores rabdovirales que puedan replicar en las células infectadas pero que no sean capaces de pasar de célula a célula. También existe la posibilidad de manipular el tropismo celular mediado por la proteína G de tal manera que el vector rabdoviral sólo transfiera genes a determinadas dianas celulares, lo cual sería muy importante para el desarrollo de estos vectores para terapia génica.

Además el uso de esta tecnología permite introducir marcadores genéticos fácilmente detectables (por ejemplo, sitios nuevos de corte para enzimas de restricción) que permitirían diferenciar animales vacunados de portadores asintomáticos (supervivientes a la infección), con lo que se aumentan sus posibilidades de utilización.

APLICACION A RABDOVIRUS DNA INFECTIVOS DE PECES

La organización genómica del VNHI se conoce completamente gracias a su reciente secuenciación por dos laboratorios independientes (Morzunov *et al.*, 1995; Schutze *et al.*, 1995). Se ha demostrado su estructura 3'-N-M1-M2-G-NV-L 5', así como la presencia de las secuencias intergénicas (terminación de transcripción y podiadenilación) conservadas en todos los rabdovirus (-UCURUC UUUUUU RCCGUG NNNN CAC-).

La región ψ situada entre los genes G y L, es la más variable entre los genomas de los distintos rabdovirus animales. Los ejemplos extremos son el VEV y los rabdovirus de peces VNHI y VSHV. El genoma de VEV exhibe una reducción drástica de las secuencias ψ . Por el contrario, los genomas de los rabdovirus de peces poseen en las secuencias ψ un gen adicional completo, el NV, que codifica una proteína de 12KDa no estructural, de una función desconocida (Basurco y Benmansour, 1995; Basurco *et al.*, 1995; Bjorklund *et al.*, 1996; Kurath *et al.*, 1997; Kurath y Leong, 1985; Nichol *et al.*, 1995) y que no se encuentra en el

virión. Se ha demostrado ya en el virus de la rabia que la inserción de otros genes en la secuencias ψ se tolera sin afectar a la viabilidad vírica (Schnell *et al.*, 1994) y que se pueden introducir genes en ella que se expresan perfectamente (Mebatsion *et al.*, 1996). Es por ello muy probable la posible utilización de los rhabdovirus DNA infectivos de salmónidos (VNHI o VSHV) como vectores para otros genes para su uso en Acuicultura. Es necesario, no obstante, demostrar que el gen NV no es esencial para el desarrollo de los rhabdovirus de peces.

Entre los objetivos de la obtención de DNA infectivo en rhabdovirus de peces (proyecto UE FAIR CT98-4398), utilizando la tecnología antes descrita para el virus de la rabia y para el de la EV, se pretende:

1. Subclonar los genes N, P y L de VNHI en los plásmidos adecuados (Fig. 2), así como su genoma completo en sentido antígeno.
2. Optimizar la transfección de varias líneas celulares de peces para maximizar la expresión de dichos plásmidos (las líneas celulares de salmónidos ofrecen problemas de transfección debido a sus menores temperaturas de crecimiento).
3. Obtener virus VNHI infectivos a partir de cotransfección de las copias: DNA y de los genes N, P y L, en células apropiadas (Fig. 2).
4. Efectuar mutagénesis dirigida en las proteínas G de VNHI y VSHV.
5. Manipular el gen NV para comprobar que no es esencial.
6. Obtener virus VNHI mutados en la proteína G y obtener virus VNHI llevando una copia de la proteína G de VSHV insertada en el gen NV.

Con todo ello se lograría explorar las posibilidades de utilizar copias infectivas de VNHI tanto para obtención de mutantes no patógenos con ninguna o muy baja probabilidad de reversión a su forma virulenta como con posibilidades de transportar cualquier gen vírico o bacteriano en su genoma DNA.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece la ayuda en la mecanografía de J.P. Coll. Este trabajo se ha efectuado durante la financiación por los proyectos AGF97-297 y AGF98-580 de la CICYT, España y CT98-4398 y CT98-4003 del programa FAIR de la UE. M.F. está financiada por el Gobierno Vasco, Dpto. de Educación, Universidades e Investigación, España.

SUMMARY

Application of infectious rhabdoviral DNA to the development of new vectors for the treatment of infections ictiopathologies

The recent publication of the complete sequence of the negative RNA (~ 12 Kb) genome of the rhabdovirus infectious hematopoietic necrosis (IHN) of salmonids and the development of methods to allow the rescue of infective viruses from the cDNA of the rhabdovirus of rabies and of vesicular stomatitis (VSV), allows the possibility to obtain fish rhabdoviruses from infective DNA. Important possibilities are now opened to manipulate these RNA genomes which were not possible before. These manipulations can be done to obtain mutant viruses with low probabilities of reversion which can be then used as vaccines. Another possibility is to design heterologous IHN rhabdovirus which will express the protein G from other rhabdovirus (viral haemorrhagic septicaemia,

VHSV; spring carp viremia, SCV, etc.) (project UE FAIR CT98-4398). Furthermore, it would be possible to clone any other viral or bacterial protein in such a rhabdoviral DNA. The potential use as vectors increases the possibilities of application of the infective DNA rhabdovirus to control Aquaculture diseases.

KEY WORDS: Rhabdovirus infective DNA
Aquaculture

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- BASURCO B., BENMANSOUR A., 1995. Distant strains of the fish rhabdovirus VHSV maintain a sixth functional cistron which codes for a nonstructural protein of unknown function. *Virology* 212, 741-745.
- BASURCO B., COLL J.M., 1989. Spanish isolates and reference strains of viral haemorrhagic septicaemia virus shown similar protein size patterns. *Bull.Eur.Ass.Fish Pathol.* 9, 92-95.
- BASURCO B., VENDE P., MONNIER A.F., WINTON J., DEKINKELIN P., BENMANSOUR A., 1995. Genetic diversity and phylogenetic classification of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV). *Veterinary Research* 26, 460-463.
- BAUDIN F.L., 1987. IHN in France. *Bull.Eur.Ass. Fish Pathol.* 7, 104.
- BJORKLUND H.V., HIGMAN K.H., KURATH G., 1996. 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.* 42, 65-80.
- BOVO G., GIORGETTI G., JORGENSEN P.E.V., OLESEN N.J., 1987. Infectious haematopoietic necrosis: first detection in Italy. *Bull.Eur.Ass. Fish Pathol.* 7, 62-63.
- BRAÑAS M.V., COLL J.M., ESTEPA A., 1994. A sandwich ELISA to detect VHSV and IPNV in turbot. *Aquaculture International* 2, 206-217.
- BRUNSON R., TRUE K., YANCEY J., 1989. VHS virus isolated at Makah National Fish Hatchery. *Am.Fish Soc.Fish Health Newsletter* 17, 3.
- DEKINKELIN P., 1972. Le virus D'Egtved.II-Purification. *Annals Recherche Vétérinaire* 3, 199-208.
- FERNANDEZ-ALONSO M., ALVAREZ F., ESTEPA A., COLL J.M., 1998. Vacunas DNA en Acuicultura. *Aquatic*. http://aquatic.unizar.es/N1/art401/DNA_vac.htm
- FRERICHS G.N., 1989. Rhabdoviruses of fishes. *Viruses of lower vertebrates*. Ahne,W.& Kurstak,E.eds. Springer, Berlin 1, 27-32.
- HOPPER K., 1989. The isolation of VHSV from salmon at Glenwood Springs, Orcas Island, Washington. *Am.Fish Soc.Fish Health Newsletter* 17, 1.
- KOENER J.F., PASSAVANT C.W., KURATH G., LEONG J., 1987. Nucleotide sequence of a cDNA clone carrying the glycoprotein gene of Infectious Haematopoietic Necrosis virus, a fish rhabdovirus. *J.Virol.* 61, 1342-1349.
- KURATH G., HIGMAN K.H., BJORKLUND H.V., 1997. Distribution and variation of NV genes in fish rhabdoviruses. *J.Gen.Virol.* 78, 113-117.
- KURATH G., LEONG J.C., 1985. Characterization of Infectious Hematopoietic Necrosis Virus mRNA species reveals a nonviral rhabdovirus protein. *J.Virol.* 53, 462-468.
- LEONG J.C., BOOTLAND L., ANDERSON E., CHIOU P.W., DROLET B., KIM C., LORZ H., MOURICH D., ORMONDE, P., PEREZ, L., and TROBRIDGE, G. (1995). Viral vaccines for aquaculture. *J. Mar.Biotechnol.* 3, 16-23.
- LIU M.A., HILLEMANN M.R., KURTH R., 1995. DNA vaccines. A new era in vaccinology. *Annals New York Academy Sciences* 772, 1-294.
- MCALLISTER P. E., OWENS W.J., 1987. Identification of the three serotypes of Viral Haemorrhagic Septicemia Virus by immunoblot assay using antiserum to serotype F1. *Bull.Eur.Ass.Fish Pathol.* 7, 90-91.
- MCALLISTER P.E., SCHILL W.B., OWENS W.J., HODGE D.L., 1991. 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. -, 191-201.
- MEBATSION T., SCHNELL M.J., COX J.H., FINKE S., CONZELMANN K.K., 1996. Highly stable expression of a foreign gene from rabies virus vectors. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 93, 7310-7314.
- MORZUNOV S.P., WINTON J.R., NICHOL S.T., 1995. The complete genome structure and phylogenetic relationship of infectious hematopoietic necrosis virus. *Virus Res.* 38, 175-192.
- NICHOL S.T., ROWE J.E., WINTON J.R., 1995. Molecular epizootiology and evolution of the glycoprotein and non-virion protein genes of infectious hematopoietic necrosis virus, a fish rhabdovirus. *Virus Res.* 38, 159-173.

- OLESEN N.J., LORENZEN N., JORGENSEN P.E.V., 1993). Serological differences among isolates of viral haemorrhagic septicemia virus detected by neutralizing monoclonal and polyclonal antibodies. *Dis.Aquatic Organ.* 16, 163-170.
- RODRIGUEZ S., VILAS M.P., ALONSO M., PEREZ S.I., 1995. Study of a viral-dual infection in rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*) by seroneutralization, Western blot and polymerase chain reaction assays. *Microbiologia Sem* 11, 461-470.
- SCHLOTTFELDT H.J., AHNE W., VESTERGARD-JORGENSEN P.E., GLENDE W., 1991. Occurrence of viral haemorrhagic septicaemia in turbot (*Scophthalmus maximus*)-A natural outbreak. *Bull.Eur.Ass.Fish Pathol.* 11, 105-107.
- SCHNELL M.J., MEBATION T., CONZELMANN K.K., 1994. Infectious rabies viruses from cloned cDNA. *EMBO Journal* 13, 4195-4203.
- SCHUTZE H., ENZMANN P.J., KUCHLING R., MUNDT E., NIEMANN N., METTENLEITER T.C., 1995. Complete genomic sequence of the fish rhabdovirus infectious haematopoietic necrosis virus. *J.Gen.Virol.* 76, 2519-2527.
- VILAS M.P., RODRIGUEZ S., PEREZ S., 1994. A case of coinfection of IPN and IHN virus in farmed rainbow trout in Spain. *Bull.Eur.Ass.Fish Pathol.* 14, 47-50.
- WHELAN P.J., BALL L.A., BARR J.N., WERTZ G.T.W., 1995. Efficient recovery of infectious vesicular stomatitis virus entirely from cDNA clones. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 92, 8388-8392.
- WINTON J., BATTS W., DEERING R., BRUNSON R., HOPPER K., NISHIZAWA T., STEHR C., 1991. Characteristics of the first North American isolations of viral hemorrhagic septicemia virus. *Proceedings second international symposium on viruses of lower vertebrates. Oregon State Univ.Press. Corvallis.* 1, 43-50.