

Investigación actual en vacunas para la acuicultura

Rocha, A. y Coll, J.M.

Dpto. Biotecnología.

Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, INIA

Ministerio de Ciencia y Tecnología

Crt. La Coruña, Km 7 - 28040 Madrid (España)

Tel.: 91 347 68 50

Resumen

El crecimiento de la Acuicultura intensiva ha provocado un incremento de la incidencia de las enfermedades de peces causadas por virus, bacterias o parásitos. Para controlar estas enfermedades los métodos de prevención utilizando vacunas son uno de los más utilizados. Ahora bien, actualmente sólo varias enfermedades causadas por bacterias (boca roja, forunculosis y vibriosis) se han podido controlar utilizando vacunas tradicionales (bacterias inactivadas). Gracias a la aplicación de las nuevas tecnologías de DNA recombinante (la producción de antígenos por vacunas DNA y por plantas y el uso de nuevos vectores virales por genética reversa junto con los estudios sobre respuestas inmunológicas a los patógenos de las especies cultivadas, se esperan nuevos productos en este campo

Abstract

The development of intensive Aquaculture is increasing the fish diseases caused by virus, bacteria and parasites. To control these diseases the prevention method of using vaccines is one of the mostly utilized. However, as for today only a few bacterial diseases (red mouth, forunculosis and vibriosis) have been controlled by traditional vaccination (inactivated bacteria). Thanks to the new technologies of recombinant DNA: the production of antigens by DNA vaccination, plants or the use of new viral vectors by reverse genetics, together with the study of fish immunological responses to pathogens in the cultured species, new products are expected to develop in this field.

Palabras clave: vacunas, acuicultura, vacunas DNA, vectores víricos, investigación

Importancia de la vacunación en Acuicultura.

El control de las patologías tanto de virus (6) y bacterias como de parásitos eucariontes (protozoos y animales pluricelulares) en Acuicultura por todos los medios incluida la vacunación está recomendado por la FAO/OIE (FAO report nº 192,1977; Oficina Internacional de Epizootias, OIE Int. Zoo-sanitary code 1986; ICES Coop. Res., Report nº 159, 1988), y por la UE (Anon.1990: 90/C84 y 91/C67). El mayor impacto de las investigaciones en estos temas será allí donde la Acuicultura pueda influir en el desarrollo rural, ofreciendo un trabajo alternativo a las pesquerías (CEE report 111/121/87).

Nuevas metodologías de producción de vacunas y vectores.

Tradicionalmente las vacunas se han dividido en vivas (atenuadas) y muertas (inactivadas). Los peligros de estas vacunas tradicionales son la reversión y el porcentaje residual de patógeno vivo, respectivamente. Con el advenimiento de la tecnología del DNA recombinante se ha hecho posible la construcción de vectores vivos (bacterias o virus inocuos) que pueden transportar un antígeno de interés en protección contra un patógeno, o bien la producción de dicho antígeno aislado del patógeno (vacunas por subunidad) en grandes cantidades obviando la producción del patógeno (Tabla 1). Entre las vacunas por subunidades, hasta hace poco sólo se conocían las subunidades proteicas o de lipopolisacáridos. Recientemente, sin embargo, se han desarrollado vacunas genéticas o de DNA que abren perspectivas muy optimistas (21). Además, entre las vacunas proteicas se han desarrollado nuevos modelos de expresión que producen mayores cantidades, antígenos conformacionalmente más adecuados o bajan el precio de producción. Es el caso de la expresión en plantas comestibles que se puedan incorporar a los piensos (24).

TABLA 1: Tipos de vacunas.

Tipos:		Manejo virus vivos	Coste	Conformación	Duración memoria	Respuesta de cada individuo	Variación vírica
Agente Patógeno Entero:	- Vivas:	si		si	alta	si	no
	- Muertas:	no/si?		~	baja	si	no
Recombinantes: Subunidades Proteínas Envuelta	- "Vivas": virus/bacterias no patógenos	no	↓↓	si	alta	si	no
	- Muertas: bacterias	no	↓	no	baja	si/no	no
	sintéticas	no		no	baja	no	si
	levaduras	no	↓	si	baja	si	no
	insectos	no	↓	si	baja	si	no
	plantas comestibles	no	↓↓	si	baja	si	no
Recombinantes: Subunidades Genes	DNA	no	↓	si	alta	si	no

La mayoría de las proteínas eucarióticas expresadas en bacterias se pliegan incorrectamente y por lo tanto exhiben bajas actividades específicas comparadas con las proteínas nativas. Esto es lo que sucede en el caso de las proteínas virales tales como la pG de VHSV (18) o las proteínas parasitarias. Ello es debido a que la producción de proteínas eucarióticas completamente activas requiere modificaciones post-translacionales tales como, formación correcta de los puentes disulfuro, glicosilación, fosforilación, ensamblaje correcto de monómeros, procesamiento proteolítico o transporte funcional a membranas, procesos todos ellos que no pueden llevar a cabo las células bacterianas. Los sistemas de expresión de proteínas eucarióticas en células eucarióticas, incorporan tanto secuencias procarióticas para facilitar la propagación del plásmido en bacterias como secuencias eucarióticas para realizar la transcripción (promotores, señales para el procesamiento de intrones) y la traducción (señales de poliadenilación) en células eucarióticas. Los elementos procarióticos mínimos incluyen replicones, un gen de resistencia a antibióticos y sitios con múltiples dianas únicas de restricción para la incorporación del gen a expresar.

Entre las nuevas tecnologías con mayor aplicación al campo de las vacunas, cabe destacar la inmunización con plásmidos recombinantes de expresión transitoria o vacunas DNA, la expresión en plantas y la utilización de rabdovirus DNA infeccioso como vectores (genética reversa).

Inmunización con plásmidos, vacunas DNA.

Descrita en 1990 por primera vez la inyección directa de genes y su expresión transitoria en los tejidos del hospedador (vacunas DNA) se ha demostrado ya con varios genes, en varios tejidos y en especies tan diversas como ratones y peces (28, 29). Recientemente, se ha demostrado la viabilidad de la inyección de plásmidos codificando el gen G de rabdovirus de salmónidos en IHNV (1, 2, 7, 45) y en VHSV (27, 30). Existen actualmente en desarrollo, nada menos que 3 proyectos europeos FAIR en este tema solo en Acuicultura. Se abordan ya temas de seguridad medioambiental para las vacunas DNA por inyección contra rabdovirus de salmones e identificación de antígenos protectores en el caso de varias bacterias. Para su aplicación práctica en peces de pequeño tamaño es necesario además utilizar métodos por inmersión. En este sentido se han utilizado liposomas (19, 20) y ultrasonidos (en preparación).

Utilizando vacunas DNA, no se manejan virus vivos, no se necesita ensamblaje de las partículas virales y se permite la selección de péptidos relevantes a la protección por cada individuo. La conformación de las proteínas patógenas es la adecuada ya que se fabrican en el mismo huésped que en la infección natural (4, 8). Además este método podría utilizarse con varios genes simultáneamente (47).. 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 cointroducción en los plásmidos de expresión transitoria de genes modificadores de respuesta inmunológica (interleukinas, mitógenos, etc.) (19). Es de resaltar que una vez puesta a punto esta tecnología, podría fácilmente aplicarse a todos los agentes patógenos (siempre que se identifiquen los factores de virulencia/neutralización) a cualesquiera de las especies piscícolas.

Expresión en plantas transgénicas.

Una de las tendencias más modernas en los métodos de obtención de vacunas recombinantes es la expresión de proteínas en plantas transgénicas (36). Desde 1992 se ha avanzado tanto en las especies vegetales que se han conseguido transformar tales como tomates (38), tabaco (35), patata (25), etc., como en las proteínas expresadas: antígeno de la hepatitis (37, 44), enterotoxina de *E. coli* (25), anticuerpos (35), pG del rabdovirus de la rabia (38), pG del rabdovirus VSV (23), etc. Aunque la expresión no alcanza más que ~0.01% de la proteína total, este nivel ha sido suficiente para estimular linfocitos T y B (44) e inducir protección (25) en varios modelos. Esta tecnología aún no se ha aplicado a la piscicultura por lo que es una investigación abierta que ya se ha propuesto a la UE.

Rabdovirus DNA infeccioso como vectores.

La reciente elucidación de las secuencias completas del genoma RNA negativo ($\cong 12$ Kb) de los rabdovirus de la necrosis hematopoyética infecciosa (NHI) (39, 43) y de la septicemia hemorrágica vírica (VHSV) (42) de salmónidos y el desarrollo desde hace unos pocos años de métodos que permiten el rescate de virus infectivos a partir de cDNA tanto en los rabdovirus de la rabia como en el de la estomatitis vesicular (46), han puesto al alcance de la mano la posibilidad de obtener rabdovirus de peces a partir de DNA infectivo (12). Se abren con ello importantes posibilidades de manipulación de estos genomas RNA hasta ahora imposibles. En el caso de los virus RNA-, todas las proteínas víricas (N,P,L,) que forman el molde correcto para replicación y transcripción del RNA deben suministrarse junto con el genoma completo para poder obtener virus infecciosos a partir de DNA infectivo, lo que aumenta la dificultad técnica de estos métodos. Dicha manipulación puede hacerse con el objeto de obtener virus mutantes atenuados de bajas probabilidades de reversión que pudieran utilizarse 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, para después recuperarlos en el virión. Otra posibilidad es la de diseñar rabdovirus IHN heterólogos que expresaran las proteínas G de otros rabdovirus (VHSV, viremia primaveral de la carpa, VPC, etc.). Parece posible que más adelante se puedan desarrollar vectores rabdovirales que 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 detectables (por ejemplo, con sitios nuevos de corte para enzimas de restricción) que permitirían diferenciar animales vacunados de portadores asintomáticos. Además sería posible clonar cualquier otra proteína vírica o bacteriana en rabdovirus DNA infectivos. En el proyecto UE FAIR CT98-4398, se ha conseguido recientemente la recuperación de virus IHN infectivos con este método (Dr. Bremont, comunicación personal) (5).

Inmunología de peces.

El estudio de la inmunología de las especies piscícolas es de gran importancia para una adecuada optimización de las vacunas (31).

Por ejemplo, en el modelo rabdovirus/VHSV se han puesto a punto métodos (17) *in vitro* (clonaje en coágulos de fibrina, ensayos de inmunoproliferación) para demostrar la infección y la replicación del rabdovirus VHSV en los leucocitos de riñón de trucha y la susceptibilidad a este virus de las colonias inducidas por mitógenos (16). Con este mismo sistema *in vitro*, se ha demostrado que la proteína G aislada del VSHV es capaz de estimular la proliferación *in vitro* de los leucocitos procedentes de riñón de trucha resistente al VSHV (13, 14), por lo que se puede aprovechar este sistema para estudiar y optimizar muchas de las características de una vacunación efectiva.

Se han estudiado además las respuestas inmunoproliferativas anamnésicas *in vitro* de truchas supervivientes a VHSV usando sus linfocitos y las proteínas virales aisladas (9, 17), fragmentos recombinantes de las proteínas virales (18) y péptidos virales (33, 34). Utilizando estos métodos se ha llegado a aislar linfocitos de trucha dependientes de

antígeno G de VHSV, los primeros "linfocitos T" obtenidos *in vitro* de cualquier pez (10, 11, 15, 26, 41). También se han analizado las propiedades antigénicas tanto sus epítomos lineales como conformacionales de la proteína G de VHSV, utilizando AcP, AcM y Ac de trucha (22).

Para sobrevivir a la infección tal y como se demuestra mediante ensayos *in vitro* de inmunoproliferación, cada trucha individual reconoce un epitomo T lineal o péptido distinto en la proteína G (33, 34). La posible vacuna ha de contener por lo tanto todos los posibles epítomos de esta proteína ya que las poblaciones de trucha son heterogéneas. Es muy posible que esto ocurra con cualquier otro antígeno relevante en la protección de otros patógenos.

Debido a la naturaleza conformacional de los epítomos de protección contra VHSV, *in vivo* no se obtiene, ni antigenicidad, ni protección, usando fragmentos recombinantes expresados en vectores procariontes, tales como *E. coli* y *Yersinia ruckeri* (18), resultado corroborado por otros laboratorios (3, 32), aunque tampoco falta algún resultado algo positivo utilizando *A. salmonicida* (40). La mejor protección hasta ahora se ha obtenido con proteína G de VHSV recombinante (G4) expresada en levadura (18).

Los resultados obtenidos y discutidos brevemente arriba en el modelo rhabdovirus/trucha son un ejemplo de las dificultades que se encuentran al desarrollar cualquier vacuna contra patógenos en Acuicultura y se explica un poco más las enormes dificultades que tienen estos desarrollos para llegar a una vacuna comercial fiable.

Agradecimientos.

Se agradece la mecanografía de este trabajo a J.P. Coll. Este trabajo fue financiado por los proyectos INIA SC00046 y CICYT AGF98-580 de España y CT984003 y CT984398 del programa FAIR de la UE.

Bibliografía

1. **Anderson, E. D., D. V. Mourich, S. C. Fahrenkrug, S. C. LaPatra, J. Shepherd, and J. C. Leong.** 1996. Genetic immunization of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against infectious hematopoietic necrosis virus. *Molecular Marine Biology Biotechnology*. **5**:114-122.
2. **Anderson, E. D., D. V. Mourich, and J. C. Leong.** 1996. Gene expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following intramuscular injection of DNA. *Molecular Marine Biology Biotechnology*. **5**:105-113.
3. **Bearzotti, M., A. F. Monnier, P. Vende, J. Grosclaude, P. DeKinkelin, and A. Benmansour.** 1995. The glycoprotein of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV): antigenicity and role in virulence. *Veterinary Research*. **26**:413-422.
4. **Betancourt, O. H., J. Attal, M. C. Théron, C. Puissant, and L. M. Houdebine.** 1993. Efficiency of introns from various origins in fish cells. *Molecular Marine Biology Biotechnology*. **2**:181-188.
5. **Biacchesi, S., Y. Yu, M. Bearzotti, C. Tafalla, M. Fernandez-Alonso, and M. Bremont.** 2000. Rescue of synthetic salmonid rhabdovirus minigenomes. *J. Gen. Virol.* **81**:1941-1945.
6. **Coll, J. M.** 1999. Prevalencia de las rabdovirus en la Acuicultura Europea. *AquaTIC* **6**: <http://aquatic.unizar.es/n2/art602/rabdoUE.htm>.
7. **Corbeil, S., S. E. LaPatra, E. D. Anderson, and G. Kurath.** 2000. Nanogram quantities of a DNA vaccine protect rainbow trout fry against heterologous strains of infectious hematopoietic necrosis virus. *Vaccine*. **18**:2817-824.

8. **Donnelly, J. J., J. B. Ulmer, and M. A. Liu.** 1994. Immunization with DNA. *J. Immunol. Methods.* **176**:145-152.
9. **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.
10. **Estepa, A., F. Alvarez, A. Ezquerro, and J. M. Coll.** 1999. Viral-antigen dependence and T-cell receptor expression in leucocytes from rhabdovirus immunized trout. An in vitro model to study fish anti-viral responses. *Veterinary Immunology Immunopathology.* **68**:73-89.
11. **Estepa, A., F. Alvarez, A. Villena, and J. M. Coll.** 1996. Morphology of antigen-dependent haematopoietic cells from trout surviving rhabdoviral infections. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* **16**:203-207.
12. **Estepa, A., M. Bremont, M. Fernandez-Alonso, and J. M. Coll.** 1999. Aplicación de rhabdovirus DNA infeccioso para el desarrollo de un nuevo vector para tratar ictiopatologías infecciosas. *Investigaciones Agrarias.* **14**:85-93.
13. **Estepa, A., and J. M. Coll.** 1992. 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.
14. **Estepa, A., and J. M. Coll.** 1991. In vitro infection of trout kidney cells with infectious pancreatic necrosis and viral haemorrhagic septicaemia viruses. *Bulletin European Associated Fish Diseases.* **11**:101-104.
15. **Estepa, A., and J. M. Coll.** 1997. An in vitro method to obtain T-lymphocyte like cells from the trout. *J. Immunol. Methods.* **202**:77-83.
16. **Estepa, A., and J. M. Coll.** 1991. Infection of mitogen stimulated colonies from trout kidney cell cultures with salmonid viruses. *J. Fish Dis.* **14**:555-562.
17. **Estepa, A., and J. M. Coll.** 1992. Mitogen-Induced proliferation of trout kidney leucocytes by one-step culture in fibrin clots. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **32**:165-177.
18. **Estepa, A., M. Thiry, and J. M. Coll.** 1994. Recombinant protein fragments from haemorrhagic septicaemia rhabdovirus stimulate trout leucocyte anamnestic in vitro responses. *J. Gen. Virol.* **75**:1329-1338.
19. **Fernandez-Alonso, M., F. Alvarez, A. Estepa, R. Blasco, and J. M. Coll.** 1999. A model to study fish DNA immersion-vaccination by using the green fluorescent protein. *J. Fish Dis.* **22**:237-241.
20. **Fernandez-Alonso, M., F. Alvarez, A. Estepa, and J. M. Coll.** 1998. Vacunas DNA en Acuicultura. *AquaTIC 4*: http://aquatic.unizar.es/N1/art401/DNA_vac.htm.
21. **Fernandez-Alonso, M., and J. M. Coll.** 1999. Variables en la vacunación DNA en el modelo trucha rhabdovirus. *Investigaciones Agrarias.* **14**:103-115.
22. **Fernandez-Alonso, M., G. Lorenzo, L. Perez, R. Bullido, A. Estepa, N. Lorenzen, and J. M. Coll.** 1999. Mapping of the lineal antibody epitopes of the glycoprotein of VHSV, a salmonid rhabdovirus. *Dis. Aquatic Organ.* **34**:167-176.
23. **Galbraith, D. W., C. A. Zether, K. R. Harkins, and C. L. Alonso.** 1992. Biosynthesis, processing and targeting of the G-protein of vesicular stomatitis virus in tobacco protoplast. *Planta.* **186**:324-336.
24. **Gudding, R., A. Lillehaug, and O. Evensen.** 1999. Recent developments in fish vaccinology. *Veterinary Immunology Immunopathology.* **72**:203-212.
25. **Haq, T. A., H. S. Mason, J. D. Clements, and C. J. Arntzen.** 1995. Oral immunization with a recombinant bacterial antigen produced in transgenic plants. *Science.* **268**:714-716.
26. **Hawke, N. A., J. P. Rast, and G. W. Litman.** 1996. Extensive diversity of transcribed TCR-beta in a phylogenetically primitive vertebrate. *J. Immunol.* **156**:2458-2464.
27. **Heppell, J., N. Lorenzen, N. K. Armstrong, T. Wu, E. Lorenzen, K. Einer-Jensen, P. Ahrens, J. Schorr, and H. L. Davis.** 1998. Development of DNA vaccines for fish: vector design, intramuscular injection and antigen expression using viral haemorrhagic septicaemia virus genes as model. *Fish Shellfish Immunology.* **8**:271-287.
28. **Kanellos, T., I. D. Sylvester, A. G. Ambali, C. R. Howard, and P. H. Russell.** 1999. The safety and longevity of DNA vaccines for fish. *Immunology.* **96**:307-313.
29. **Lewis, P. J., and L. A. Babiuk.** 1999. *DNA vaccines: a review. Advances in Virus Research.* ed. Maramorosch, K., Murphy, F. A. and Shatkin, A. J. **54**:129-188.
30. **Lorenzen, N., E. Lorenzen, K. Eoner-jensen, J. Heppell, T. Wu, and H. Davis.** 1998. Protective immunity to VHS in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) following DNA vaccination. *Fish Shellfish Immunology.* **8**:261-270.

31. **Lorenzen, N., N. J. Olesen, and C. Koch.** 1999. Immunity to VHS virus in rainbow trout. *Aquaculture*. **172**:41-61.
32. **Lorenzen, N., N. J. Olesen, P. E. Vestergaard-Jorgensen, M. Etzerodt, T. L. Holtet, and M. C. Thorgersen.** 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.
33. **Lorenzo, G., A. Estepa, S. Chilmoneczyk, and J. M. Coll.** 1995. Mapping of the G and N regions of viral haemorrhagic septicemia virus (VHSV) inducing lymphoproliferation by pepscan. *Veterinary Research*. **26**:521-525.
34. **Lorenzo, G. A., A. Estepa, S. Chilmoneczyk, and J. M. Coll.** 1995. Different peptides from haemorrhagic septicemia rhabdoviral proteins stimulate leucocyte proliferation with individual fish variation. *Virology*. **212**:348-355.
35. **Ma, J. K. C., A. Hiatt, M. Hein, N. D. Vine, F. Wang, P. Stabila, C. VanDolleweerd, K. Mostov, and T. Lehner.** 1995. Generation and assembly of secretory antibodies in plants. *Science*. **268**:716-719.
36. **Mason, H. S., and C. J. Arntzen.** 1995. Transgenic plants as vaccine production systems. *Trends Biotechnology*. **13**:388-392.
37. **Mason, H. S., D. M. K. Lam, and C. J. Arntzen.** 1992. Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **89**:11745-11749.
38. **McGarvey, P. B., J. Hammond, M. M. Dienelt, D. C. Hooper, Z. F. Fu, B. Dietzschold, H. Koprowski, and F. H. Michaels.** 1995. Expression of the rabies virus glycoprotein in transgenic tomatoes. *Biotechnology*. **13**:1484-1487.
39. **Morzunov, S. P., J. R. Winton, and S. T. Nichol.** 1995. The complete genome structure and phylogenetic relationship of infectious hematopoietic necrosis virus. *Virus Res.* **38**:175-192.
40. **Noonan, B., P. J. Enzmann, and T. J. Trust.** 1995. Recombinant infectious necrosis virus and viral hemorrhagic septicemia virus glycoprotein epitopes expressed in aeromonas salmonicida induce protective immunity in rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*). *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:3586-3591.
41. **Partula, S., A. DeGuerra, J. S. Fellah, and J. Charlemagna.** 1995. Structure and diversity of the T cell antigen receptor beta-chain in a teleost fish. *J. Immunol.* **155**:699-706.
42. **Schuetze, H., M. Egbert, and Mettenleiter.** 1999. Complete genomic sequence of viral hemorrhagic septicemia virus, a fish rhabdovirus. *Virus genes*. **19**:59-65.
43. **Schuetze, H., P. J. Enzmann, R. Kuchling, E. Mundt, N. Niemann, and T. C. Mettenleiter.** 1995. Complete genomic sequence of the fish rhabdovirus infectious haematopoietic necrosis virus. *J. Gen. Virol.* **76**:2519-2527.
44. **Thanavala, Y., Y. F. Yang, P. Lyons, H. S. Mason, and C. Arntzen.** 1995. Immunogenicity of transgenic plant-derived hepatitis B surface antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **92**:3358-3361.
45. **Traxler, G. S., E. Anderson, S. E. LaPatra, J. Richard, B. Shewmaker, and G. Kurath.** 1999. Naked DNA vaccination of Atlantic salmon *Salmo salar* against IHNV. *Dis. Aquatic Organ.* **38**:183-190.
46. **Whelan, P. J., L. A. Ball, J. N. Barr, and G. T. W. Wertz.** 1995. Efficient recovery of infectious vesicular stomatitis virus entirely from cDNA clones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **92**:8388-8392.
47. **Whinton, J. L., N. Sheng, M. B. A. Oldstone, and T. A. McKee.** 1993. A "String-of-Beads" vaccine, comprising linked minigenes, confers protection from lethal-dose virus challenge. *J. Virol.* **67**:348-352.

