

DETECCION DE VIRUS EN SALMONICULTURA: PECES ENFERMOS O PECES PORTADORES

J.M. COLL

Dpto. Sanidad Animal. INIA-CISA, Valdeolmos. 28130 Madrid

RESUMEN

Las técnicas de cultivo celular que se usan para incrementar el número de virus y las técnicas más usadas para identificación de virus en salmónidos (tales como la neutralización y la inmunofluorescencia además de otras menos utilizadas, como la inmunoperoxidasa, fijación de complemento, hemaglutinación, microscopia electrónica, inmunoprecipitación, inmunodifusión o radioinmunoensayo), están siendo poco a poco sustituidas por otras tecnologías, tales como los ensayos inmunoquímicos (inmunodot y ELISA) y la hibridación con sondas DNA. Gracias a los recientes desarrollos en anticuerpos monoclonales y en amplificación de DNA por polimerasas termoestables (PCR), el ELISA y la hibridación están aumentando la sensibilidad del ELISA e hibridación, de tal manera que, probablemente, también permitirán la detección de los bajos niveles de virus presentes en los peces portadores y en huevos. El uso consecutivo del ELISA primero y de la PCR después puede contribuir decisivamente a la automatización de ensayos de alta sensibilidad. Otros nuevos métodos, tales como la estimación de los anticuerpos anti-virus o la reestimulación de la memoria celular inmunológica, están actualmente en desarrollo.

PALABRAS CLAVE: Detección

Virus

Salmonicultura

Peces enfermos

Peces portadores

ENFERMEDADES VIRICAS DE SALMONIDOS Y SU DIAGNOSTICO

La necrosis pancreática infecciosa (NPI), la septicemia hemorrágica vírica (SHV) y la necrosis hematopoyética infecciosa (NHI), son las enfermedades víricas que causan mayores mortalidades en salmonicultura en todo el mundo. La inicialmente americana NHI que fue detectada en Italia (Bobo *et al.*, 1987) y Francia (Baudin, 1987), y muy recientemente en los Pirineos (Adroit, 1991, comunicación personal), es un problema actual de la Comunidad Europea (EC, 1990). Por otra parte, el SHV se ha detectado recientemente en Norteamérica (Winton *et al.*, 1991, comunicación personal).

La aplicación de métodos de diagnóstico rápido (para detectar virus en peces enfermos) y sensibles (para detectar peces portadores), es deseable si la diseminación de estos virus se quiere controlar, ya que no existen vacunas para combatir estas enfermedades.

Recibido: 27-12-91

Aceptado para su publicación: 11-8-92

Invest. Agr.: Prod. Sanid. anim.; Vol. 7(3), 1992

Un diagnóstico rápido es necesario durante la fase clínica de la enfermedad, mientras que un diagnóstico sensible es necesario para poder detectar virus durante la fase de portadores (Fig. 1).

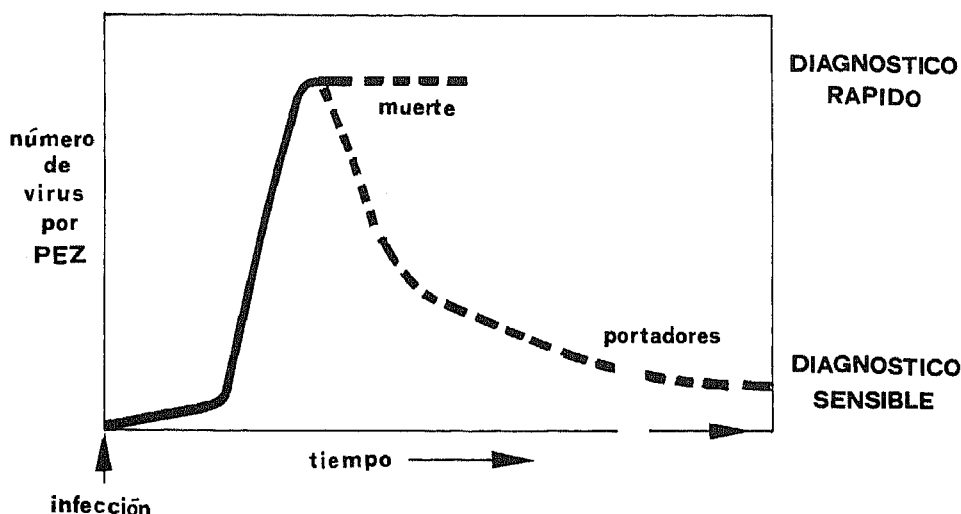


Fig. 1.—Fases de una infección vírica en el pez.

Phases of fish viral infections.

Después de la infección el virus se va replicando pero sin manifestaciones clínicas. Sigue una fase virémica en la que se detectan cantidades importantes de virus. Más tarde aparece una reacción inmunológica del huésped lo que provoca una disminución del número de virus que puede ser total (curación) o parcial (animales portadores). En el caso de que las defensas inmunológicas no puedan con la infección, la enfermedad termina con la muerte. Durante la fase clínica el diagnóstico ha de ser rápido, mientras que durante la fase de portadores el diagnóstico ha de ser sensible.

Las enfermedades víricas y otras enfermedades de los salmónidos tienen dos componentes principales, el agente patógeno (virus) y el hospedador (salmónidos). Los métodos de diagnóstico de la enfermedad pueden, por lo tanto, dividirse en aquellos que detectan el virus y aquellos que detectan la respuesta de los salmónidos a la infección viral. Para detectar el virus, es necesario, primero aumentar el contenido vírico de la muestra y segundo, identificar el virus. Para identificar el virus podemos estudiar su actividad, sus proteínas, sus ácidos nucleicos o su morfología. Para detectar la reacción de los salmónidos podemos estudiar, bien sus defensas humerales (anticuerpos o inmunoglobulinas Igs) o bien, sus defensas celulares.

Las técnicas descritas hasta ahora para la identificación de virus (Ahne, 1981; McIntosh *et al.*, 1960) han sido, la neutralización (Guittino *et al.*, 1980; Deuter, Enzman, 1986), la inmunofluorescencia o inmunoperoxidasa (Piper *et al.*, 1973; Swanson, Guillespie, 1981) la microscopia electrónica (Zwillenberg *et al.*, 1965; Cohen, Lenoir, 1974; Amlacher *et al.*, 1980; Olberding, Frost, 1975), la inmunoelectroforesis (Dea, Elazhary, 1983), la aglutinación (Kimura *et al.*, 1984), la fijación de complemento (Finlay, Hill, 1975); el radioinmunoensayo (Hsu, Leong, 1985), el ELISA (Nicholson, Caswell, 1982) y el inmunodot (McAllister, Schill, 1986).

MUESTREO DE LAS POBLACIONES DE SALMONIDOS

La exactitud del diagnóstico de una enfermedad viral depende principalmente del número de virus por volumen de muestra. A su vez, el número de virus por volumen de muestra depende del número de peces con virus, del número de virus por pez (Fig. 2) y de la dilución final de la muestra antes del análisis.

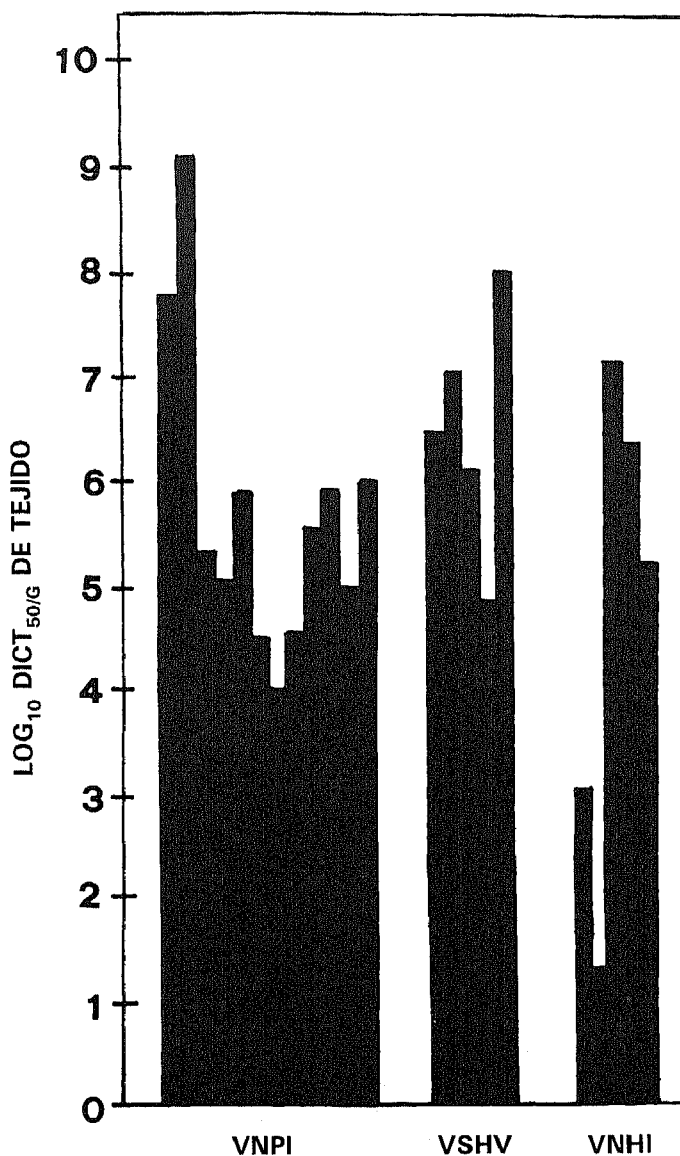


Fig. 2.—Cantidades de virus estimadas por DICT₅₀ (cultivos celulares) en salmónidos infectados con virus durante la fase virémica.

Stimulation of virus by DICT₅₀ (cell culture) in salmonid fishes infected with viruses during viraemia.
 Datos procedentes de distintos autores.

Cuando se muestrea una población de salmónidos, se ha de recolectar un número estadísticamente suficiente de peces según el porcentaje de peces portadores de virus (Fig. 3). Para el muestreo, los peces deben agruparse por edades, origen, especies, variedad y tomas de agua (Kevin, 1989). Para determinar el número de peces que se debe analizar en una población de peces aparentemente sanos, hay que suponer un porcentaje mínimo de portadores de virus. El número de peces necesario para detectar al menos 1 pez portador en una población aparentemente sana se puede calcular con un 95 p. 100 de nivel de confianza según una distribución de Poisson (Ammend, Vedemeyer, 1970). Por ejemplo, para un tamaño de población de 1.000 peces, con un 10 p. 100 de portadores víricos, se deben analizar 27 peces (Fig. 3). Durante una fase clínica, sin embargo, para aumentar la probabilidad de detectar virus, se pueden seleccionar aquellos peces moribundos entre todos los de la población y analizarlos por separado.

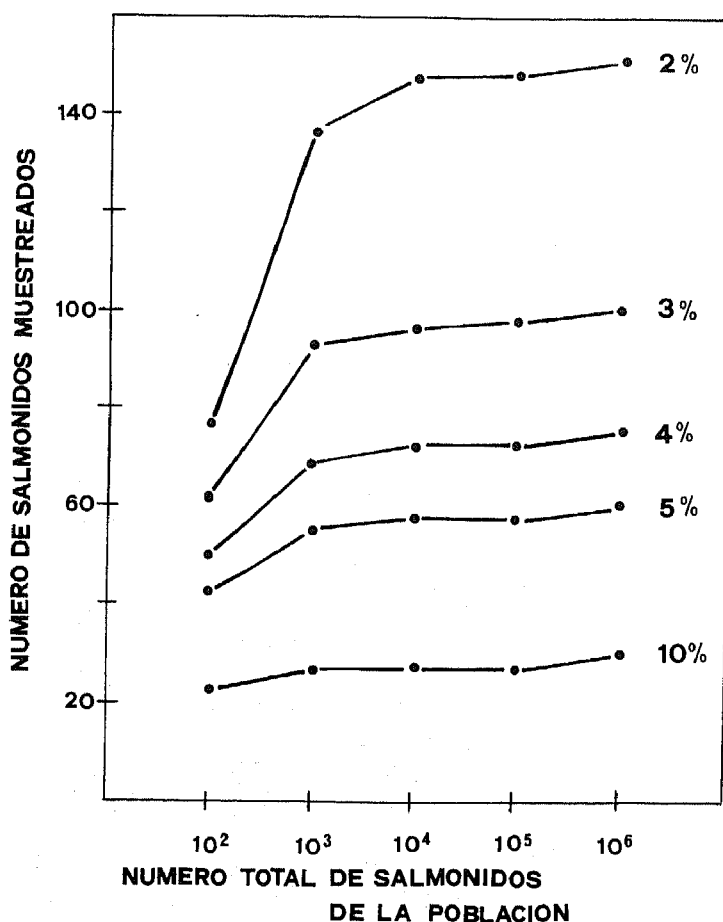


Fig. 3.—Número de salmónidos a muestrear para detectar a un portador según el número total de salmónidos y el porcentaje de portadores de la población.

Number of salmonid fishes to be sampled for carrier detection according to their total number and the percentage of carriers in their population.

Calculado según la distribución de Poisson para un 95 p. 100 de confianza. Los peces se analizan en grupos de cinco y se supone que un pez portador tiene 10^3 DICT₅₀ por g (Amend, Wedemeyer, 1970).

Para detectar virus durante la fase de portadores, en frezas, alevines, fluidos ováricos, esperma o muestras de vísceras, se pueden combinar las muestras individuales en grupos de 10 en 10. En estas mezclas se supone que si un solo pez en el grupo (10 p. 100 de portadores) contiene 10^3 DICT₅₀/g, el portador del virus se puede detectar. La posibilidad de detectar la presencia del virus se aumentará si se usan grupos de menos peces (por ejemplo, si el ensayo se hace individualmente) o si existe un porcentaje de portadores mayor. Para aumentar la sensibilidad, por ejemplo, en alevines, la cabeza y la cola se pueden eliminar antes de homogeneizarlos. Otro factor que afecta la sensibilidad es la dilución de la muestra antes del análisis. Por ejemplo, para la seroneutralización, después de mezclar las muestras, se diluyen 10 veces para homogeneizarlas. Más tarde y para evitar la toxicidad en el cultivo celular, se hace otra dilución de 10 veces al homogeneizado (Dixon, 1987) antes de su inoculación al cultivo (dilución final 100 veces), por lo tanto, la concentración de virus es ahora de 10 DICT₅₀/ml. Es decir, al menos 100 μ l (1 DICT₅₀) de un homogeneizado procedente de un grupo de 10 peces debe ser inoculado en el cultivo para poder detectar virus en una población con un 10 p. 100 de portadores.

Para obtener homogeneizados individuales pueden usarse homogeneizadores múltiples hechos en placas de 96 pocillos (300 μ l por pocillo) con 96 cilindros terminados en plano. Las muestras individuales de vísceras se ponen en pocillos y los 96 se homogenizan simultáneamente rotando el homogenizador manualmente sobre los pocillos. Otros aspectos relativos al ahorro de tiempo que supone este sistema, son lo fácil de la disposición de las muestras, lo compacto del almacenamiento de las muestras y la facilidad de pipeteo mediante el uso de pipetas multicanales (French-Constan, Devonshire, 1987).

ENRIQUECIMIENTO DEL CONTENIDO VIRICO DE LAS MUESTRAS

Una vez que el muestreo ha sido optimizado, el contenido vírico de los homogeneizados necesita de un incremento del número de virus mediante multiplicación en cultivos celulares (Amos, 1985; Lannan *et al.*, 1984; Wolf, Mann, 1980). Actualmente, el método más sensible para detección del VNPI es el del cocultivo de líneas celulares con células de riñón o de sangre del pez a ensayar (Ahne, Thomsen, 1986; Agius *et al.*, 1982). Se esperan nuevos desarrollos en este área debido a la reciente posibilidad de amplificar los genomas víricos con la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Esta amplificación puede tener lugar en unas pocas horas y desde un volumen de extractos de tejidos mayor, debido a que los ácidos nucleicos pueden extraerse y concentrarse a un volumen final muy pequeño. Además la PCR puede hacerse altamente específica para el virus cuya presencia quiera detectarse mediante selección de los oligonucleótidos adecuados (ver más adelante). De esta manera se pueden realizar la amplificación y la identificación del virus simultáneamente.

ANTICUERPOS ANTI-VIRUS

Para identificar la presencia de proteínas víricas en extractos de tejidos de peces infectados o en cultivos celulares, deben prepararse anticuerpos (Ac) específicos anti-virus. Estos pueden ser anticuerpos policlonales (AcP) o anticuerpos monoclonales (AcM).

No existen diferencias significativas en el contenido de proteínas entre los diferentes aislados víricos (Basurco, Coll, 1989a). Por ejemplo, ng de proteína de rhabdovirus re-

presenta 10^7 partículas víricas (Hsu, Leong, 1985). Ahora bien, debido a que sólo 1 de cada 1.000 partículas víricas suele ser infectiva, sólo 10^4 virus son detectables por cultivos celulares en 1 ng de virus. La ventaja de los métodos inmunológicos para detectar estas cantidades es que reaccionan con proteínas víricas que no necesariamente están incorporadas a una partícula infectiva.

Se han usado una gran variedad de protocolos de inmunización para obtener AcP en conejos contra el VSHV y el VNHI, pero los títulos de neutralización obtenidos han sido generalmente muy bajos (10^2 — 10^4) (Hill *et al.*, 1981; Habashi *et al.*, 1975), comparados con los títulos (10^6) que se obtienen contra el VNPI. Además, los AcP que se obtienen contra todos estos virus contienen Ac anti-virus pero también Ac contra la línea celular que se usó para obtenerlos o contra los tejidos de peces. Estos Ac pueden reducirse, pero no eliminarse totalmente, por adsorción con extractos de líneas celulares o de tejidos. Alternativamente, los virus para obtener los AcP pueden obtenerse en líneas celulares que sean antigénicamente distintas de la línea celular que se usa rutinariamente para el diagnóstico y así reducir los fondos y las reactividades cruzadas causadas por los extractos celulares.

Antes de que los AcM pudieran usarse, la mayoría de los inmunoensayos utilizaban la fracción de inmunoglobulinas de un suero inmune para preparar los reactivos. Ahora bien, el mejor suero inmune sólo contiene el 10 p. 100 de Ac específicos anti-virus, lo que significa una disminución del 10 p. 100 de actividad específica y mayores fondos o problemas de reacciones cruzadas. Los Ac anti-virus purificados por cromatografía de afinidad sobre virus purificados y acoplados a una fase sólida, no tienen los problemas arriba indicados pero es difícil obtenerlos mediante esta técnica por la gran cantidad de virus que se necesitaría para las columnas de afinidad.

Se han obtenido y caracterizado AcM contra el VNPI (Wolski *et al.*, 1986; Domínguez *et al.*, 1990; Caswell-Reno *et al.*, 1986), VSHV (Mourton *et al.*, 1990; Lorenzen *et al.*, 1988; Sanz *et al.*, 1992) y VNHI (Schultz *et al.*, 1985; Winton *et al.*, 1988; Ristow, Arnzen, 1991).

TECNICAS PARA LA IDENTIFICACION DE PROTEINAS VIRICAS

Neutralización. Mediante el uso de AcP como reactivos de neutralización ha sido posible diferenciar tres serotipos del VNPI aunque esta clasificación es controvertida. Por ejemplo, se ha pretendido agrupar todos los aislados de VNPI en dos grupos con un total de hasta nueve serotipos en un primer grupo (Hill, Way, 1983). Sin embargo, pueden encontrarse diferencias antigénicas importantes aún dentro del mismo grupo serológico (Hill, Way, 1980; Nicholson, Pochebit, 1981; Mc Donald, Grower, 1981; Okamoto *et al.*, 1983) y por otra parte se han demostrado relaciones antigénicas también importantes entre distintos serotipos, tanto por inmunodifusión, como por inmunofluorescencia (Ishiguro *et al.*, 1984). Por neutralización, ha sido posible diferenciar tres serotipos del VSHV (Le Berre *et al.*, 1977; Ahne *et al.*, 1986), pero no se han demostrado ni reacciones cruzadas entre los VSHV y los VNHI (Mc Allister *et al.*, 1974), ni diferentes serotipos de VNHI (Engelking *et al.*, 1991). Los AcM neutralizantes son difíciles de obtener contra el VNPI (Domínguez *et al.*, 1990), contra el VSHV (Lorenzen *et al.*, 1990; Sanz *et al.*, en preparación) o contra el VNHI (Winton *et al.*, 1988) por lo que su uso en diagnóstico aún no ha sido descrito.

La variación día a día (Olesen, Vestergaard-Jorgensen, 1986), la citotoxicidad o la inhibición de la infectividad por los extractos de tejidos (Dixon, 1987) y el consumo de tiempo y de trabajo que exigen los ensayos de neutralización necesitan de otras alternativas.

TABLA 1
COMPARACION DE LA SENSIBILIDAD DE ENSAYOS INMUNOENZIMATICOS INDIRECTOS

Comparison of sensitivity of indirect immunoassays

Virus	Ac	Método	VP, mg/ml	SCC, DICT ₅₀ /ml	ET, TCID ₅₀ /g	Ref.
NPI	P	F	—	10 ⁵	—	a
	P	A	—	10 ³	10 ³	b
	P	dot	85	10 ⁵	—	c
	M	dot	20	10 ⁵	—	d
SHV	P	dot	400	10 ⁵	—	e
NHI	P	dot	400	10 ⁵	—	f
	P	dot	1.000	—	—	g
	M	dot	550	10 ⁴	F.P.	h

VP, virus purificado; SCC, sobrenadante de cultivo celular; ET, extracto de tejido; F, fluorescencia; A, aglutinación. dot, técnica inmunoenzimática que utiliza gotas (dot) sobre nitrocelulosa. P, policlonal; M, monoclonal; Ac, anticuerpo; NPI, necrosis pancreática infecciosa; SHV, septicemia hemorrágica vírica; NHI, necrosis hematopoiética infecciosa.

La sensibilidad se definió como la mínima cantidad de virus que producía diferencias significativas con el control. F.P., falsos positivos; —, no determinado.

Referencias: a) Swanson, Guillespie, 1981; b) Kimura *et al.*, 1984; c) Mc Allister, Schill, 1986; d) Hsu *et al.*, 1989; e), f) Mc Allister, Schill, 1986; g) Hsu, Leong, 1985; h) Schultz *et al.*, 1989.

Inmunofluorescencia. Esta técnica ha sido muy usada para la detección de antígenos víricos en cultivos celulares y en tejidos de pez (Ahne *et al.*, 1986; Meier, Vestergaard-Jorgensen, 1975; Menezes, 1977). Para detectar virus por inmunofluorescencia, los cultivos hechos en portaobjetos se infectan y fijan antes o al comienzo del efecto citopático. La mitad del portaobjetos se puede usar para reacción con anti-VSHV y la otra mitad con anti-VNPI. Los cultivos infectados con 10 virus por célula necesitan unas 8 h. para poder observarse inmunofluorescencia, mientras que con 1 virus por célula se necesitan por los menos 18 h. (Vestergaard-Jorgensen, 1968, 1972, 1974). Una de las desventajas de esta técnica es la necesidad de tejidos frescos o congelados rápidamente. Además, algunos tejidos tienen autofluorescencia y la existencia de anticuerpos con reacciones cruzadas puede interferir una interpretación correcta de los resultados (Ahne, 1981). Aunque la absorción de los AcP con extractos de tejidos del pez contribuye a disminuir la fluorescencia inespecífica, los títulos de virus en animales portadores no siempre se asocian con el número de células fluorescentes (Vestergaard-Jorgensen, Meyling, 1972). Queda por demostrar si el uso de AcM para esta técnica aumentará su sensibilidad (Tabla 1, Wolski *et al.*, 1986; Winton *et al.*, 1988; Lehmann *et al.*, 1990).

Inmunoperoxidasa. La técnica de la inmunoperoxidasa aporta una serie de ventajas cuando se la compara con la de inmunofluorescencia, tales como la eliminación o reducción de fondos, el uso de un microscopio ordinario y la posibilidad de guardar indefinidamente los resultados. La inmunoperoxidasa se considera de mayor sensibilidad que la inmunofluorescencia debido a que es capaz de detectar antes la presencia de virus en los cultivos. Ahora bien, sólo cuando los títulos de virus son $> 10^8$ DICT₅₀/g de bazo o de

rión (es decir, durante la fase clínica), las muestras dan resultados positivos (Faisal, Ahne, 1980). La necesidad de eliminar la peroxidasa endógena adiciona un paso más a esta técnica. Tanto la inmunofluorescencia como la inmunoperoxidasa requieren cultivos celulares o tejidos seccionados. Debido a su baja sensibilidad y la necesidad de procesamiento muestra a muestra, estas técnicas no son útiles para detectar portadores (Nicholson, Henchal, 1978). Queda por demostrar si el uso de AcM para esta técnica aumentará su sensibilidad.

Aglutinación. Aunque se ha usado principalmente para detectar bacterias, también se ha usado para detectar virus de salmónidos. Es una técnica simple, específica, barata, fácilmente semicuantificable y con posibilidad de uso en campo, sin requerir aparatos especiales. Los resultados de diagnóstico, sin embargo, han de ser confirmados por otras técnicas debido a la alta incidencia de falsos positivos (Yoshimizu, Kimura, 1985). Los cultivos celulares infectados con virus se fijan, después se añade *staphylococcus aureus* Cowan Strain A (capaz de ligar IgG) sensibilizada con AcP anti-virus, se lavan y la preparación se tiñe. El número medio de bacterias ligadas por célula varía entre 0,5 en cultivos no infectados y 10 en cultivos infectados (Bragg, Combrink, 1987). En otros test de aglutinación, los tejidos de los peces afectados se homogeneizan, centrifugan y el sobrenadante se mezcla con la bacteria sensibilizada. En los casos positivos se observa la aglutinación visualmente. Por microscopía electrónica, las bacterias aglutinadas muestran virus en su superficie (Yoshimizu, Kimura, 1985). El título mínimo de VNPI en cultivo celular detectable por esta técnica fue de 10^6 DICT₅₀/ml (Kimura *et al.*, 1984) y en tejidos de salmónidos fue de 10^3 DICT₅₀/g (Tabla 1). El antígeno se detectaba después de una dilución de 80 veces simplemente aumentando el tiempo de la aglutinación de 30 a 90 min (Kimura *et al.*, 1984). Ni el látex ni los AcM se han aplicado mediante esta técnica a los virus de los salmónidos.

Enzimoimmunoensayo, ELISA. El ELISA ha ganado en aceptación, como un método rápido, específico, y sensible para detectar e identificar los virus de salmónidos (Dixon, Hill, 1983). Las mayores ventajas del ELISA son el procesamiento rápido de grandes números de muestras y la reproducibilidad (Coll, 1991a). Las muestras que contienen una mezcla de virus infeccioso, virus no infeccioso y antígenos específicos de virus, reaccionan en ELISA incluso aunque no puedan ser identificadas como muestras conteniendo virus infeccioso (Dixon, 1985).

En los primeros informes del uso de AcP para detectar VNPI por ELISA, se describieron sensibilidades de 10^5 DICT₅₀/ml de cultivo celular y de 10^4 — 10^7 DICT₅₀/g de pez infectado (Nicholson, Caswell, 1982; Dixon, Hill, 1983). Los antígenos virales se podían detectar 24 h. antes del efecto citopático en cultivos celulares. La sensibilidad fue de 10 ng/ml en ausencia de extractos de pez y de 100 ng/ml en presencia de extractos de pez. Los peces, truchas moribundas durante una infección con 90 p. 100 de mortalidad tuvieron un valor alto por ELISA. Hattori *et al.*, (1984), fueron capaces de detectar 10^4 DICT₅₀/ml y Rodack *et al.*, 1988 llegaron a 10^3 DICT₅₀/ml. El uso de AcM descrito por Domínguez *et al.*, (1990) consiguió niveles de detección de 10^3 DICT₅₀/ml (unos 10 ng de virus purificado/ml). Estas diferencias de sensibilidad parecen depender de la calidad de los Acs, la cantidad de Ac ligado a la fase sólida o a la presencia de cantidades variables de partículas virales no infectivas en la muestra (Tabla 2). El uso de 2 AcM no competitivos ha permitido el uso del ensayo por la técnica de un solo paso (Domínguez *et al.* 1990) reduciendo tiempo (30 min) y esfuerzo, aunque se da la posibilidad de producir efectos prozona y se baja la sensibilidad. El virus puede ser detectado durante la fase clínica, pero la sensibilidad todavía no es suficiente para detectar portadores (Tabla 2). El

uso del ELISA para detectar portadores del VNPI podría ser posible si su sensibilidad pudiera mejorarse (Hattori *et al.*, 1984). Así la sensibilidad del ensayo alcanzó 10^3 DICT₅₀/ml cuando se usó peroxidasa y AcM en vez de fosfatasa y AcP (Rodack *et al.*, 1988; Domínguez *et al.*, 1990; Babin *et al.*, 1990). También se ha descrito un método para el serotipaje rápido del VNPI usando AcM por ELISA (Domínguez *et al.*, 1991).

TABLA 2
COMPARACION DE LA SENSIBILIDAD DEL SANDWICH ELISA
Comparison of sensitivity of sandwich ELISA

Virus	Ac ⁺ , µg/pocillo	VP, mg/ml	SCC, DICT ₅₀ /ml	ET*, DICT ₅₀ /g	Ref.
NPI	0.5 P	10	10^5	10^4	a
	100.0 P	50	10^4	10^4	b
	1.0 P	—	10^3	—	c
	0.2 M	10	10^3	—	d
SHV	100.0 P	—	10^5	10^5	e
	1.0 M	1	10^5	—	f
	1.0 M	0.2	10^3	10^3	g
NHI	100.0 P	—	10^5	10^6	h
	100.0 P	—	10^6	10^6	i

La sensibilidad se definió como la mínima cantidad de virus que producía el doble de absorbencia que el fondo. **PV**, virus purificado; **CCS**, sobrenadante de cultivo celular; **TE**, extracto de tejido, +, Cada pocillo se recubrió con 100 µl de fracción inmunoglobulínica a 37 °C o a 4 °C. *, Para VNHI y VSHV se calculó para extractos de tejido diluidos 5 veces a partir de 5×10^6 TCID₅₀/g de tejido, **P**, policlonal; **M**, monoclonal; **Ac**, anticuerpo; —, no determinado.

Referencias: a) Dixon, Hill, 1983; b) Hattori *et al.*, 1984; c) Rodack *et al.*, 1988; d) Domínguez *et al.*, 1990; e) Way, Dixon, 1988; f) Mourton *et al.*, 1990; g) Sanz, Coll, 1991a, b; h) Dixon, Hill, 1984; i) Way, Dixon, 1988.

La técnica ELISA usando AcP se ha adaptado a los rabdovirus de salmónidos VNHI (Dixon, Hill, 1984) y al VSHV (Way, Dixon, 1988). Los virus se pueden detectar en cultivo celular antes del efecto citopático y ambos ensayos son específicos para cada uno de sus virus respectivos. Los resultados se obtuvieron en menos de 2 h., pero la sensibilidad fue todavía uno de los principales problemas (Tabla 2). Una mejora importante de la sensibilidad hasta 1 ng/ml ó 0,2 ng/ml (Tabla 2) se ha demostrado recientemente para el VSHV usando AcM específicos de serotipo contra la proteína G (Mourton *et al.*, 1990) o reconociendo todos los serotipos contra la proteína N (Fig. 4; Sanz, Coll, 1990, 1991, 1992).

El aumento de sensibilidad en el ELISA en fase sólida depende entre otras variables de la cantidad de Ac específico ligado a la fase sólida. El límite de Ac que pueden absorberse al pocillo de una placa ELISA está limitado por la fracción de Ac específica presente en la preparación de Ac y por la superficie del pocillo. Suponiendo una absorción de los Ac al poliestireno de 1,5 ng/mm² y 150 KDa para una molécula de inmunoglobulina, la máxima concentración que se puede obtener para un AcM purificado por cromatografía de afinidad sobre antígeno inmovilizado es alrededor de 10^{-8} M (1 µg/pocillo). Para AcP purificados por afinidad, AcP en suero o suero obtenido post-infección, se obtendría alrededor de 3, 10 ó 100 veces menos Ac específico.

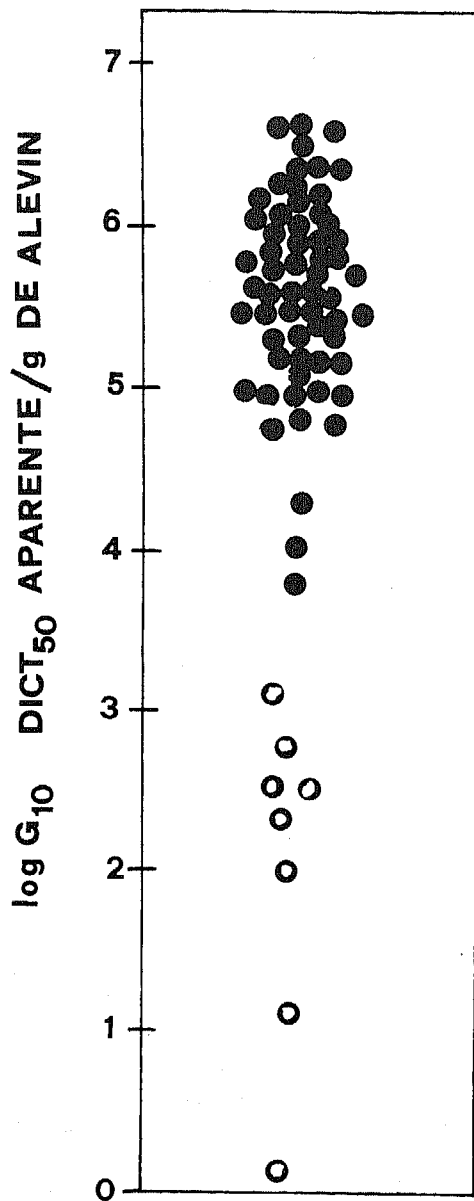


Fig. 4.—Cantidades de virus estimadas por ELISA en truchas control (o) y truchas infectadas (•) con VSH
Estimated virus by ELISA in control and VHSV-infected trout.

Las concentraciones de virus se calcularon usando curvas estándar realizadas con virus estimado por DICT₅₀. Los alevines de trucha (0,2-1 g por pez) se infectaron con 10⁶ DICT₅₀/ml 2 h a 90° C. La mortalidad total después de 20 días fue 77,6 p. 100. Los peces muertos se homogeneizaron en 2 ml de medio de cultivo y se analizaron por ELISA utilizando 2 AcM no competitivos, un solo paso y alta fuerza iónica para romper las nucleocapsidas víricas (modificado de Sanz, Coll, 1992).

Immunodot. Otras técnicas, bien requieren instrumentos, manipulaciones complicadas, tienen baja sensibilidad o requieren mucho tiempo (Hsu *et al.*, 1989; Shultz *et al.*, 1989). Estas son algunas de las razones que se adujeron en favor de la técnica del inmunodot más simple y rápida y capaz de detectar 20 ng/ml ó 10^5 DICT₅₀/ml en VNPI (Tabla 1). En este ensayo las proteínas virales se ligan a una fase sólida, generalmente nitrocelulosa y se detectan por su reacción inmunoenzimática. Los resultados se pueden interpretar visualmente como negativos o positivos (coloreados) y se pueden cuantificar por densitometría de reflexión. Debido a que la nitrocelulosa tiene una mayor capacidad de ligamiento de proteínas ($50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) que el poliestireno ($1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), el inmunodot, en teoría, podría obtener mayores sensibilidades que el ELISA. Ahora bien, debido a que los sustratos que se necesitan tienen que ser precipitables, la sensibilidad final del inmunodot resulta ser de la misma magnitud que el ELISA. Una ventaja adicional del inmunodot es que se pueden guardar los resultados indefinidamente (Hsu *et al.*, 1989).

Usando AcP con títulos de neutralización de 3×10^6 (VNPI) o de 5×10^2 (VSHV o VNHI), el ensayo inmunodot detectó 0,8 ng de VNPI ó 4 ng de rhabdovirus VSHV o VNHI (Mc Allister, Schill, 1986). Las reacciones cruzadas de los AcP se eliminaron por absorción de los antiseros con suero fetal de ternera y con extractos de las células utilizadas para cultivar el virus. La sensibilidad podría haberse aumentado simplemente aumentando el volumen de muestra, pero la nitrocelulosa se satura con proteínas cuando se usan extractos de tejidos (Mc Allister, Schill, 1986). El paso de la muestra por cultivo celular, además de amplificar el contenido viral disminuye su contenido de proteínas incrementando la sensibilidad. Menos de 1 ng de proteína de VNHI se puede detectar por marcaje radioactivo de proteínas virales (Hsu, Leong, 1985), pero la detección inmunológica ofrece las ventajas de coste, precisión, velocidad y en el caso de reactivos inmunoenzimáticos, su estabilidad y facilidad de manejo. Además los métodos inmunológicos también permiten obtener información acerca de las relaciones de distintos aislados. Los AcM se han desarrollado y aplicado al test de inmunodot (Lilipun *et al.*, 1989; Caswell-Reno *et al.*, 1989; Babin *et al.*, 1991). Schultz *et al.*, (1989), desarrollaron un test the inmunodot para detección de VNHI utilizando AcM que detectó 10^2 DICT₅₀. Debido a que el inmunodot detecta Ac totales y no sólo los neutralizantes, fue además posible la identificación de los 3 serotipos del VSHV usando AcP contra uno de ellos (Mc Allister, Owens, 1987). Finalmente, si pudiera desarrollarse un sandwich dot, esta técnica podría usarse en el campo.

TECNICAS PARA LA IDENTIFICACION DE GENOMAS VIRALES

La hibridación de DNA se ha usado para estudiar la divergencia genómica entre serotipos del VNPI (Mc Donald, Gower, 1981), sin embargo, no existen muchos informes sobre el uso de sondas DNA para la detección de virus de salmónidos. Ya se han construido plásmidos conteniendo secuencias genómicas del VNPI (Duncan *et al.*, 1987), VNHI (Gilmore, Leong, 1988) y VSHV (Bernard *et al.*, 1990) que podrían usarse para estas técnicas. Debido a que la hibridación de DNA no es más sensible que el ELISA (Enzman *et al.*, 1981), su uso práctico en diagnóstico estará probablemente muy ligado al desarrollo de métodos de amplificación genómica basados en la reacción en cadena de las polimerasas termoestables de DNA (PCR) (Sobrino *et al.*, 1989). Las secuencias de los genomas de los VNPI, VSHV y VNHI se han elucidado y pueden utilizarse para seleccionar los oligonucleótidos específicos necesarios para la amplificación PCR mediante programas de ordenador (Lowe *et al.*, 1990).

La amplificación selectiva de fragmentos de genomas virales mediante el uso de oligonucleótidos específicos de secuencia y el uso de procedimientos no radioactivos y automatizables para la detección posterior de las secuencias amplificadas, resolverá muy probablemente los problemas de sensibilidad y de procesamiento de grandes números de muestras necesarios para poder detectar virus en animales o huevos portadores (Coll, 1991).

Una sonda de DNA biotinilado para detección rápida de VNHI se ha diseñado para detectar el RNA mensajero de la proteína N (la más conservada entre distintos aislados virales). Una secuencia diana de 30 nucleótidos se escogió en la secuencia genómica publicada de la proteína N del VNHI mediante búsqueda con ordenador. Después se sintetizó un oligonucleótido complementario a la diana genómica acoplado con biotina y su hibridación al RNA mensajero presente en las células infectadas se detectó con estreptavidina marcada con peroxidasa. La sonda desarrollada es específica del VNHI y puede detectar la infección de los cultivos después de 24h. (Winton, 1991). Arakawa *et al.*, (1990), han descrito el uso de la técnica de la PCR para amplificar una región genómica de 252 nucleótidos que contiene la porción donde se localiza la sonda mencionada anteriormente. El uso de la PCR permitió amplificar el RNA extraído de salmónidos infectados con VNHI hasta niveles fácilmente detectables por hibridación con la sonda de 30 nucleótidos. Para amplificar segmentos del VNHI (522 bp), VHSV (408 bp) y VNPI (339 bp) se han usado oligonucleótidos específicos para sus respectivos virus en cultivo celular y para diferenciar los virus según el tamaño del DNA amplificado (Mc Allister *et al.*, comunicación personal).

Una estrategia distinta actualmente en desarrollo, usa la incorporación de un nucleótido marcado con biotina durante la amplificación de un segmento del VHSV definida por dos oligonucleótidos en la proteína M₁ (no publicado). El producto amplificado se hibrida con una sonda plasmídica inmovilizada en fase sólida en placas de 96 pocillos (HYBRE-LISA). La aplicación de reactivos de alta especificidad previamente desarrollados para el ELISA, por ejemplo, un tampón de diluciones estable dos años a temperatura ambiente, adición de mertiolato al tampón de hibridación para aumentar su estabilidad, adición de formamida para disminuir la temperatura de hibridación, adición de rojo de fenol para permitir la visualización de los pocillos pipeteados y controlar el pH, posibilidad de usar las placas de 96 pocillos divididas en columnas para adaptarse al número variable de muestras y el uso de un tampón sustrato de bajo fondo, hacen que esta técnica de hibridación, sea fácilmente escalable, altamente reproducible, y capaz para ensayar un gran número de muestras (Coll, 1991b). La aplicación de este método a los ensayos rutinarios de laboratorio está actualmente en desarrollo.

Tanto el VNPI como el VHSV se han podido detectar capturándolos primero con AcM (Domínguez *et al.*, 1990; Sanz, Coll, 1992) en fase sólida (ELISA) y amplificando sus genomas después con PCR (en colaboración con F. Ponz).

ESTIMACION DE LAS RESPUESTAS DE ANTICUERPOS EN SALMONIDOS

Una historia de infecciones virales se manifiesta en un aumento de 5-10 veces en el contenido de las inmunoglobulinas del suero de trucha (Sánchez *et al.*, 1989). Sin embargo, los títulos de Ac neutralizantes del VNPI medidos en el suero de trucha criada en ausencia de VNPI (títulos de 80 a 4.000) y con infecciones de VNPI (títulos de 300 a 3.000) no demostraron diferencias significativas. En truchas infectadas con VNPI artificialmente, los títulos de Ac neutralizantes aumentaron desde 400 a 2.800 (Vestergaard-

Jorgensen, 1973). De los datos arriba expuestos se deduce lo difícil que va a ser darles un significado diagnóstico a los Ac anti-VNPI en salmónidos.

Debido a que para neutralizar el VSHV con inmunoglobulinas de salmónidos se necesita complemento (Dorson *et al.*, 1979; Dorson, Torchy, 1979), éste debe ser incluido en los ensayos correspondientes (Olesen, Vestergaard-Jorgensen, 1986). Títulos máximos de hasta 10.000 se encontraron varias semanas después de la infección, con un 40 p. 100 de la población superviviente todavía con títulos de 160 un año después. En una encuesta de varias granjas con historias previas de VSHV, el 25 p. 100 de los peces tenían todavía títulos de 160 (Olesen, Vestergaard-Jorgensen, 1986).

En EE.UU. la mortalidad debida al VNHI varía entre el 20-30 p. 100 de los alevines de salmónidos. La mortalidad durante la enfermedad puede llegar hasta el 90 p. 100 de los peces infectados (Shors, Winston, 1989). Se han detectado Ac neutralizantes contra el VNHI en huevos, lo que explicaría por qué los alevines están sanos durante un período después de la eclosión y luego son objeto de una infección aguda (Shors, Winston, 1989). Ahora bien, también se ha encontrado VNPI en huevos (Fijan, Giorgetti, 1978) por lo que la inmunidad parental pasiva puede que no sea general para todos los virus. Se necesita una mayor evidencia experimental para esclarecer estos temas.

El ELISA indirecto se ha usado para detectar respuestas de Ac a la infección viral, sin embargo, mientras que para detectar Ac anti-virus en ratón o en conejos se necesitan 2-5 μ g de virus por pocillo, para detectar Ac anti-virus en salmónidos se necesitan 200-500 μ g por pocillo (Cossarini-Dunier, 1985). Los Ac de salmónidos tienen una baja afinidad hacia el virus y una alta afinidad por las superficies de plástico, lo que aumenta los fondos del ELISA y da lugar a falsos positivos. Para definir un valor de corte entre verdaderos positivos y negativos se tendrían que utilizar grandes números de peces con una historia previa sin enfermedades virales. Recientemente para solucionar los problemas arriba indicados se ha descrito un ELISA de captura de VSHV sobre el que se puede estimar los Ac anti-VSHV. Este ELISA fue más sensible y simple de usar que la inmunofluorescencia o la neutralización. Por este método se encontraron Ac anti-VSHV en un 54 p. 100 de las truchas supervivientes de granjas infectadas (Olesen *et al.*, 1991).

Otros métodos alternativos para medir Ac de salmónidos anti-VSHV, tales como ELISAS de captura de Ac podrían también estudiarse (Sánchez *et al.*, 1990, 1991; Thuvander *et al.*, 1990).

ESTIMACION DE LAS RESPUESTAS CELULARES

Las investigaciones de las respuestas celulares de salmónidos a las infecciones víricas son muy pocas. La estimulación de linfocitos se ha demostrado en peces supervivientes a la infección con VSHV (Chilmonczyk, 1977, 1978; Estepa *et al.*, 1991) y linfocitos portadores del VNPI se han demostrado por inmunofluorescencia (Enzman, 1981) aunque no se pudieron detectar los Ac anti-VNPI correspondientes en su suero (Vestergaard-Jorgensen, 1971). Los linfocitos portadores de virus podrán detectarse por citofluorometría, (Rodríguez Saint-Jean *et al.*, 1991), sin embargo, esta técnica casi sólo se ha usado para estudiar linfocitos procedentes de peces sanos (De Luca *et al.*, 1983; Evans *et al.*, 1987). El efecto de la infección viral *in vitro* de los linfocitos de salmónidos sanos y las respuestas de los linfocitos de salmónidos supervivientes a VSHV a la adición de virus inactivados o de proteínas virales purificadas, es objeto de investigación actualmente (Estepa, Coll, 1991a, b). Los leucocitos procedentes de riñón de truchas supervivientes a dos infecciones de VSHV son capaces de proliferar (tal y como se puede esti-

mar por incorporación de timidina tritiada y por el método de los coágulos de fibrina) sólo cuando se añaden a sus cultivos las proteínas N o G purificadas a partir del virus. La capacidad de respuesta dura por lo menos durante 1 año (Estepa *et al.*, 1991). No se sabe todavía si estas técnicas podrán aplicarse como un método rutinario de diagnóstico para detectar portadores.

CONCLUSIONES

El diagnóstico vírico en salmónidos continúa haciéndose por aislamiento de virus en monocapas de células de peces, seguido por neutralización del virus con AcP. Desafortunadamente ésta es también la técnica más larga (Tabla 3). La inmunofluorescencia es un método alternativo de una mayor rapidez, ahora bien, es menos sensible y, por lo tanto, válido sólo durante la fase clínica de la enfermedad. Otras técnicas tales como la inmunoperoxidasa, la microscopia electrónica (Zwillenberg *et al.*, 1965; Cohen, Lenoir, 1974; Amlacher *et al.*, 1980; Olberding, Frost, 1975), la inmunoelectroforesis (Dea, Elazhay, 1983), la fijación de complemento (Finlay, Hill, 1975), la aglutinación o el radioinmunoensayo, no han alcanzado una amplia aceptación.

TABLA 3
COMPARACION ENTRE LAS DISTINTAS TECNICAS DE POSIBLE USO EN EL
DIAGNOSTICO DE LAS ENFERMEDADES VIRICAS DE SALMONIDOS

Comparison of techniques of possible use for diagnosis of the viral diseases of salmonids

Técnicas	S	V	E	C	A	Cu
VIRUS						
Neutralización	Alta	Lenta	Alta	No	No	Sí
Inmunofluorescencia	Media	Rápida	Media	No	No	Sí
Aglutinación	Baja	Rápida	Media	Sí	No	Sí
Inmunodot	Media	Rápida	Alta	No	No	Sí
ELISA (AcM)	Media	Rápida	Alta	Sí	Sí	No
PCR	Alta	Rápida	Alta	No	Si	No
RESPUESTAS DE LOS SALMONIDOS						
Ac ELISA	Media	Rápida	Media	Sí	Sí	No
Linfocitos	Alta	Lenta	Alta	No	No	Sí

La sensibilidad (S) se ha clasificado como alta (1 virus); media (10^3 – 10^4 virus) y baja (10^4). La velocidad (V) se ha clasificado en rápida (horas) y lenta (semanas). La especificidad (E) se ha dividido en alta (bajo porcentaje de falsos positivos) y media (alto porcentaje de falsos positivos). La posibilidad de usar el ensayo en el campo (C) se relaciona con la simplicidad de uso de la técnica. La posibilidad de automatización (A) permite el procesamiento de grandes números de muestras. La necesidad de cultivos celulares (Cu) se considera como una dificultad técnica adicional para el ensayo.

La detección de virus mediante ELISA sandwich con AcM es una técnica alternativa creciendo en importancia aunque todavía restringida a la fase clínica de la infección. El inmunodot es rápido, sensible y cuantitativo, pero en contraste con el ELISA, sólo se puede usar con cultivos celulares infectados. El ELISA es la técnica a usar para un diag-

nóstico rápido durante la enfermedad (Tabla 4) o para un diagnóstico de portadores si su sensibilidad pudiera incrementarse (Coll, 1989). Idealmente, podría usarse un panel de distintos sistemas ELISA (VNPI, VSHV y VNHI) para una detección rápida y diagnóstico fiable durante la fase clínica.

Para ser capaces de detectar salmónidos portadores de virus, hay que esperar al desarrollo de métodos con una mayor sensibilidad. Entre éstos pueden incluirse, la estimación de los Ac de salmónido anti-virus, la estimación de la memoria celular por cultivo *in vitro* de linfocitos de salmónidos con proteínas virales aisladas y la amplificación y detección de genomas virales mediante la técnica PCR y el HYBRELISA, respectivamente.

TABLA 4
EJEMPLO DE RESULTADOS DE DIAGNOSTICO MEDIANTE EL USO
DE ELISAS SANDWICH

Example of diagnostic results by the use of sandwich ELISA

Especie (g/pez)	Mortalidad	Llegada	Cultivo	NPI	SHV	Diagnóstico
Trucha (1-3)	Sí	Vivos	+	+	—	VNPI
Trucha (1-3)	Sí	Vivos	+	+	—	VNPI
Trucha (1-3)	Sí	Vivos	+	+	—	VNPI
Trucha (1-3)	Sí	Refrig.	—	—	—	<i>Streptococcus</i>
Trucha (1-3)	Sí	Vivos	—	—	—	No identificado
Trucha (50-100)	Sí	Vivos	+	—	+	VSHV
Trucha (50-100)	Sí	Vivos	+	—	+	VSHV
Trucha (50-100)	Sí	Refrig.	—	—	—	Calidad de agua
Trucha (50-100)	Sí	Refrig.	—	—	—	<i>Streptococcus</i>
Trucha (50-100)	No	Congl.	—	—	—	Sanos
Trucha (50-100)	No	Refrig.	—	—	—	Sanos
Trucha (50-100)	No	Vivos	—	—	—	Sanos
Salmón (100-200)	No	Congl.	—	—	—	Sanos
Salmón (100-200)	No	Congl.	—	—	—	Sanos
Salmón (100-200)	No	Congl.	—	—	—	Sanos
Barbo (50-100)	Sí	Refrig.	—	—	—	Calidad de agua
Barbo (50-100)	Sí	Refrig.	—	—	—	Calidad de agua
Dorada (3-10)	No	Vivos	—	—	—	Sanos
Dorada (3-10)	No	Vivos	—	—	—	Sanos
Dorada (3-10)	No	Vivos	—	—	—	Sanos
Carpa (500-1.000)	Sí	Refrig.	+	—	—	VPC

Las vísceras de pez o el riñón se mezclaron en grupos de 5-10 peces y se homogenizaron al 10 p. 100 peso/volumen y se ensayaron por cultivos celulares según métodos estándar (Jiménez *et al.*, 1988; Basurco, Coll, 1989). Los resultados de los cultivos celulares se obtuvieron después de 2 pases consecutivos en líneas celulares de peces EPC o RTG-2 de 7 días por pase. El ELISA del VNPI se llevó a cabo también en el sobrenadante obtenido después del primer cultivo. El ELISA se llevó a cabo directamente en el homogeneizado por el método de 1 paso (Sanz, Coll, 1992). VPC, viremia primaveral de la carpa. Trucha (*Onchorynchus mykiss*, W.); Salmón (*Salmo salar*, L.); Barbo (*Barbus graellsii*, L.); Dorada (*Sparus auratus*, L.); Carpa (*Cyprinus carpio*, L.).

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado durante el proyecto de Investigación n.º 8568 del Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.

SUMMARY

Viral detection in salmonid culture; disease or carrier fish

Cell culture for amplification and the techniques most used for identification of salmonid viruses, neutralization, immunofluorescence and to a lesser extent, immunoperoxidase, complement fixation, agglutination, electron microscopy, immunodiffusion or radioimmunoassay, may soon be replaced by other techniques such as enzyme immunoassays (immunodot and enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) and hybridization with DNA probes. It is expected that developments in monoclonal antibodies (MAbs) and amplification by the polymerase chain reaction (PCR), will increase sensitivity of both enzyme immunoassays and DNA hybridizations, respectively. Other diagnostic methods, such as the measurement of virus specific salmonid immunoglobulins (Igs) by ELISA or the stimulation of immunological cellular memory by in vitro coculture of salmonid lymphocytes with viral proteins, could also be further developed. The use of a first ELISA followed by PCR can help the automation of this high sensitivity assays. These new methods should provide detection of the low levels of virus present in adult carriers and perhaps but more complicated in eggs.

KEY WORDS: Diagnostic
Viruses
Salmonid fish
Sick fishes
Carrier fishes

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- AGIUS A., MARGUMUIRYO M., JOHNSON H. R., SAMIL D. A., 1982. A more sensitive technique for isolating IPNV from asymptomatic carrier rainbow trout, *Salmo gairdneri*, Richardson: J. Fish Dis., 5, 285-292.
- AHNE W., 1981. Serological techniques currently used in fish virology. In international Symposium on Fish Biologics: serodiagnostics and vaccines, Leetown. W. Ya, USA, Develop. Biol. Standard, 49, 3-27 (S. Karger, Basel).
- AHNE W., DELVENTHAL H., KOHLMAYER V., THOMSEN I., 1986. Nachweis von IPNV-aantikörpern in forellen seren mit der indirekten Immunofluoreszenztechnik, J. Vet. Med., 33, 145-148.
- AHNE W., THOMSEN I., 1986. Infectious pancreatic necrosis: detection of virus and antibodies in rainbow trout IPNV-carrier (*salmo gairdneri*). J. Vet. Med., 33, 552-554.
- AHNE W., JORGENSEN P. E., OLESEN N. J., SCHAFER W., STEINHAGEN P., 1986. Egtved virus: Occurrence of strains not clearly identifiable by means of virus neutralization tests. J. Appl. Ichthyol., 4, 187-189.
- AMEND D. F., WEDEMEYER G., 1970. Approved procedure for determinin absence of infectious pancreatic necrosis (IPN) virus in certain fish and fish products. Bureau of Sport Fisheries and Wildlife, Washington D. C. FDL-27, 4 pp.
- AMLACHER E., UDE J., RUDOLF C., ERNST G., 1980. Direct electron microscopical visualization of the presumptive virus of viral haemorrhagic septicaemia (VHS) in the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, and additional histopathological and haematological observation. J. Fish Dis., 3, 55-62.
- AMOS K. H., 1985. Procedures for the detection and identification of certain fish pathogens. 3d. ed. Fish Health Section, American Fisheries Society. Corvallis, Oregon.
- ARAKAWA C. K., DEERING R. E., HIGMAN K. H., OSHIMA K. H., O'HARA P. J., WINTON J. R., 1990. Polymerase chain reaction (PCR) amplification of a nucleoprotein gene sequence of infectious hematopoietic necrosis virus. Dis. Aquatic. Org., 8, 165-170.
- ARNZEN J. M., RISTOW S. S., HESSON C. P. LIENTZ J., 1991. Rapid fluorescent antibody tests for infection hematopoietic necrosis virus (IHNV) utilizing monoclonal antibodies to the nucleoprotein and glycoprotein. J. Aquatic. Health, 3, 109-113.
- BABIN M., HERNANDEZ C., SANCHEZ C., DOMINGUEZ J., 1990. Detección rápida del virus de la necrosis pancreática infecciosa por enzimo-inmuno-adsorción de captura. Med. Vet., 7, 557-560.

- BABIN M., HERNANDEZ C., SANCHEZ C., DOMINGUEZ J., 1991. Immunodot assay for detection of IPN virus in organ homogenates. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 11, 65-67.
- BAUDIN F. L., 1987. IHN in France. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 7, 104.
- BASURCO B., COLL J. M., 1989a. 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., COLL J. M., 1989b. Variabilidad del virus de la septicemia hemorrágica viral de la trucha en España. *Med. Vet.*, 6, 425-430.
- BASURCO B., SANZ F., MARCOTEGUI M. A., COLL J. M., 1991. The free nucleocapsids of the viral haemorrhagic septicaemia virus contain two antigenically related nucleoproteins. *Arch. Virol.*, 119, 153-163.
- BERNARD J., LECOCQ-XHONNEUX F., ROSSIUS M., THIRY M. E., DE KINKELIN P., 1990. Cloning and sequencing the messenger RNA of the N gene of viral haemorrhagic septicaemia virus. *J. Gen. Virol.*, 71, 1669-1674.
- 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.
- BRAGG R. R., COMBRINK M. E., 1987. Immunostaphylococcus protein A (ISPA) test for the identification of infectious pancreatic necrosis virus and viral haemorrhagic septicaemia virus. *Bull. Europ. Ass. Fish Pathol.*, 7, 32-34.
- CASWELL-RENO P., RENO P. W., NICHOLSON B. L., 1986. Monoclonal antibodies to infectious pancreatic necrosis virus: analysis of viral epitopes and comparison of different isolates. *J. Gen. Virol.*, 67, 2193-2205.
- CASWELL-RENO, P., LIPIUN V., RENO P. W., NICHOLSON B. L., 1989. Use of a group-reactive and other monoclonal antibodies in an enzyme immunodot assay for identification and presumptive serotyping of aquatic birnaviruses. *J. Clin. Microbiol.*, 27, 1924-1929.
- CHILMONCZYK S., 1978. Stimulation spécifique des lymphocytes de truites arc-en-ciel (*Salmo gairdneri*) résistantes a la septicémie hemorrhagique virale. *C. R. Acad. Sci.*, 287, 387-389.
- CHILMONCZYK S., 1977. Stimulations spécifiques des lymphocytes de truites arc-en-ciel résistantes a la SHV. *Bull. Off. Int. Epiz.*, 87, 395-396.
- COHEN J., LENOIR G., 1974. Ultrastructure et morphologie de quatre rhabdovirus de poissons. *Ann. Rech. Veter.*, 5, 443-450.
- COLL J. M., 1989. Addition of reducing agents to the peroxidase-o-phenylenediamine buffer reduces background of enzyme immunoassays. *Rev. Esp. Fisiol.*, 45, 41-46.
- COLL J. M., 1991. Reproducible solid-phase enzyme immunoassays. *Inmunología*, 10, 73-85.
- COLL J. M., 1991. Hybridization of peroxidase labeled DNA probes to microtitre solidphase bound DNA (HYBRELISA). *Technique*, 3, 29-32.
- COSSARINI-DUNIER M., 1985. Indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to titrate rainbow trout serum antibodies against two pathogens: yersinia ruckeri and egtved virus. *Aquaculture*, 49, 197-208.
- DEAR S., ELAZHARY M.A.S.Y., 1983. Counter immunoelectrophoresis for identification of infectious pancreatic necrosis virus after isolation in cell culture. *Can. J. Fish Aquat. Sci.*, 40, 2200-2203.
- DELUCA D., WILSON M., WARR G. W., 1983. Lymphocyte heterogeneity in the trout, *Salmo gairdneri*, defined with monoclonal antibodies to IgM. *Eur. J. Immunol.*, 13, 546-551.
- DEUTER A., ENZMANN P. J., 1986. Comparative biochemical and serological studies on two fish-pathogenic rhabdoviruses (VHS-V and SVC-V). *J. Vet. Med.*, 33, 36-46.
- DIXON P. F., 1985. Rapid detection and identification of fish pathogens by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). In *Fish and Shellfish Pathology*. A. E. Ellis (ed.) Academic Press, 11-16.
- DIXON P. F., 1987. Inhibition of infectious pancreatic necrosis virus infectivity by extracts of rainbow trout, *Salmo gairdneri*, Richardson tissue. *J. Fish Dis.*, 10, 371-378.
- DIXON P. F., HILL B. J., 1983. Rapid detection of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *J. Gen. Virol.*, 64, 321-330.
- DIXON P. F., HILL B. J., 1984. Rapid Detection of fish rhabdoviruses by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Aquaculture*, 42, 1-12.
- DOMINGUEZ J., HEDRICK R. P., SANCHEZ-VIZCAINO J. M., 1990. Use of monoclonal antibodies for detection of infectious pancreatic necrosis virus by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Dis. Aquat. Organisms*, 8, 157-163.
- DOMINGUEZ J., BABIN M., SANCHEZ C., HEDRICK R. P., 1991. Rapid serotyping of infec-

- tious pancreatic necrosis virus by one-step enzyme-linked immunosorbent assay using monoclonal antibodies. *J. Virol. Methods*, 31, 93-104.
- DORSON M., TORCHY C., MICHEL C., 1979. Rainbow Trout complement fixation used for titration of antibodies against several pathogens. *Ann. Rech. Vet.*, 10, 529-534.
- DORSON M., TORCHY C., 1979. Complement dependent neutralization of Egtved virus by trout antibodies. *J. Fish Dis.*, 2, 345-347.
- DUCAN R., NAGY E., KRELL P. J., DOBOS P., 1987. Synthesis of the infectious pancreatic necrosis virus polyprotein, detection of a virus-encoded, and fine structure mapping of genome segment A coding regions. *J. Virol.*, 61, 3655-3664.
- E. C., 1990. European Community Doc. n.º L 276/37, 3 pp.
- ENGELKING H. M., HARRY J. B., LEONG J. C., 1991. Comparison of representative strains of infectious haematopoietic necrosis virus by serological neutralization and cross-protection assays. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 1372-1378.
- ENZMANN P. J., 1981. Rapid identification of VHS-virus from trout by immunofluorescence. *Develop. Biol. Standard*, 49, 57-62.
- ENZMANN P. J., MAIER B., BIGOTT K., 1981. Biochemical data on the RNA of VHS-V and RVC indicating a possible serological relationship. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 1, 37-39.
- ESTEPA A., COLL J. M., 1991. Infection of mitogen-stimulated trout leucocytes with salmonid viruses. *J. Fish Dis.*, 14, 555-562.
- ESTEPA A., COLL J. M., 1992. In vitro immuno stimulants for optimal responses of kidney cells from healthy trout and from trout surviving viral haemorrhagic septicaemia virus disease. *Fish and Shellfish Immunol.*, 2, 53-68.
- ESTEPA A., FRIAS D., COLL J. M., 1991. Infection of trout kidney cells cultured in fibrin clots with infectious pancreatic necrosis and viral haemorrhagic septicaemia viruses. *Bull. Eur. Ass. Fish. Pathol.*, 11, 101-104.
- ESTEPA A., BASURCO B., SANZ F., COLL J. M., 1991. Stimulation of adherent cells by the addition of purified proteins of viral haemorrhagic septicaemia virus to trout kidney cell cultures. *Viral Immunol.*, 4, 43-52.
- EVANS D. L., SMITH E. E., BROWN F. C., 1987. Nonspecific cytotoxic cells in fish (*Ictalurus punctatus*) VI. Flow cytometric analysis. *Dev. Comp. Immunol.*, 11, 95-104.
- FAISAL M., AHNE W., 1990. Use of the immunoperoxidase technique for detection of fish virus antigens. *Fish Diseases* (Ed. By Ahne). Springer Verlag, 186-192.
- FIJAN N. N., GIORGETTI G., 1978. Infectious pancreatic necrosis isolation of virus from eyed eggs of rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson. *J. Fish Dis.*, 1, 269-270.
- FINLAY J., HILL B. J., 1975. A multiple homogenizer for the rapid preparation of samples for immunoassays and electrophoresis. *Biochem. Genet.*, 25, 47-48.
- FRENCH-CONSTANT R. M., DEVONSHIRE A. L., 1987. A multiple homogeneizer for the rapid preparation of samples for immunoassays and electrophoresis. *Biochem. Genet.*, 25, 47-48.
- GHITTINO P., FIJAN N., DE KINKELIN P., 1980. Control methods for major viral diseases of fish in Europe. *Bull. Off. Inst. Epiz.*, 92, 967-978.
- GILMORE R. D., LEONG J. C., 1988. The nucleocapsid gene of infectious hematopoietic necrosis virus, a fish rhabdovirus. *Virology*, 167, 644-648.
- HATTORI M., KODAMA H., ISHIGURO S., HONDA A., MIKAMI T., IZAWA H., 1984. In vitro and in vivo detection of infectious pancreatic necrosis virus in fish by enzyme-linked immunosorbent assay. *Am. J. Vet. Res.*, 45, 1876-1879.
- HABASHI Y., SCHLORTFELDT H. J., FROST J. W., 1975. Production of antisera against the virus of viral haemorrhagic septicaemia (VHS) of rainbow trout. *Zbl. Vet. Med.*, 22, 666-672.
- HILL B. J., WAY K., 1990. Properties and interrelationship of bisegment double-stranded RNA viruses of fish and shellfish. *Proceedings of the Conference on Aquatic Animal Viruses*. Paris, pp. 22-24.
- HILL B. J., WAY K., 1983. Serological classification of fish and shellfish birnaviruses (abstract). *Fist International Conference of the Association of Fish Pathologists*, Plymouth, p. 10.
- HILL B. J., WILLIAMS R. F., FINLAY J., 1981. Preparation of antisera against fish virus disease agents. In *International Symposium of Fish Biologics: Serodiagnostics and Vaccines*, Lect-town, W. Ya USA, *Develop. Biol. Standard*, 49, 209-218 (S. Karger, Basel).
- HSU Y. L., LEONG J. C., 1985. A comparison of detection methods for infectious haematopoietic necrosis virus. *J. Fish Dis.*, 8, 1-12.
- HSU Y. L., CHIANG S. Y., LIN S. T., WU J. L., 1989. The specific detection of infectious pan-

- creatic necrosis virus in infected cells and fish by the immunodot blot method. *J. Fish Dis.*, 12, 561-571.
- ISHIGURO S., IZAWA H., KODAMA H., ONUMA M., MIKAMI T., 1984. Serological relationships among five strains of infectious pancreatic necrosis virus. *J. Fish Dis.*, 7, 127-135.
- JIMENEZ DE LA FUENTE J., MARCOTEGUI M. A., SAN JUAN M., BASURCO B., 1988. Diagnosi de viral diseases in salmonid farms in Spain. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 271, 3-4.
- KIMURA T., YOSHIMIZU M., YASUDA H., 1984. Rapid, simple serological diagnosis of infectious pancreatic necrosis by coagglutination test using antibody-sensitized staphylococci. *Fish Pathol.*, 19, 25-33.
- DE KINKELIN P., BEARZOTTI M., 1981. Immunization of rainbow trout against viral hemorrhagic septicaemia (VHS) with a thermoresistant variant of the virus. *Develop. Biol. Standard*, 49, 431-439.
- LANNAN C. N., WINTON J. R., FRYER J. L., 1984. Fish cell lines: establishment and characterization of nine cell lines from salmonids. *In Vitro*, 20, 671-676.
- LE BERRE M., DE KINKELIN P., METZGER A., 1977. Identification serologique des rhabdovirus des salmonides. *Bull. Off. Int. Epiz.*, 87, 391-393.
- LEHMANN J., MOCK D., STURENBERG F. J., 1990. A simplification of the immunofluorescence test in disposable plastic trays for demonstrating the Egtved-and IPN-virus in tissue cultures. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 10, 44-45.
- LILIPUN V., CASWELL-RENO P., HSU Y. L., WU J. L., TUNG M. C., RENO P. W., WALTANAVIJARN W., NICHOLSON B. L., 1989. Antigenic analysis of asian aquatic birnavirus isolates using monoclonal antibodies. *Fish Pathol.*, 24, 155-160.
- LORENZEN N., OLESEN N. J., WESTERGAARD-JORGENSEN P. E., 1989. Production and characterization of monoclonal antibodies to four Egtved virus structural proteins. *Dis. Aquatic Organisms*, 4, 35-42.
- LORENZEN N., OLESEN N. J., VESTERGAARD-JORGENSEN P. E., 1990. Neutralization of Egtved virus pathogenicity to cell cultures and fish by monoclonal antibodies to the viral G protein. *J. Gen. Virol.* 71, 561-567.
- LOWE T., SHAREFKIN J., YAN S. Q., DIEFFENBACH C. W., 1990. A computer program for selection of oligonucleotide primers for polymerase chain reactions. *Nucleic Acid: Res.*, 18, 1757-1761.
- MCALLISTER P. E., FRYER J. L., PILCHER K. S., 1984. An antigenic comparison between infectious hematopoietic necrosis virus (OSV strain) and the virus of haemorrhagic septicaemia of rainbow trout (*salmo gairdneri*) (Denmark strain) by cross-neutralization. *J. Wild. Dis.*, 10, 101-103.
- MCALLISTER P. E., SCHILL W. B., 1986. Immunoblot assay: a rapid and sensitive method for identification of salmonid fish viruses. *J. Wild. Dis.*, 22, 468-474.
- MCALLISTER P. E., OWENS W. J., 1987. Identification of the three serotypes of viral haemorrhagic septicaemia virus by immunoblot assay using antiserum to serotype F1. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 7, 90-91.
- MC DONALD R., GOWER D., 1981. Genomic and phenotypic divergence among serotypes of aquatic Birnaviruses (infectious pancreatic necrosis virus). *Virology*, 114, 187-195.
- MCINTOSH K., WIFFERT C., CHERNESKY M., PLOTKIN S., MATTHEIS M. J., 1980. New and useful techniques in rapid viral diagnosis. *J. Infect. Dis.*, 142, 793-802.
- MEIER W., VESTERGAARD JORGENSEN P. E., 1975. A rapid and specific method for the diagnosis of viral haemorrhagic septicaemia (VHS). *Riv. It. Piscic. Itiop. A. X.* 1, 11-18.
- MENEZES J., 1977. Septicémie hémorragique virale de la truite arc-en-ciel: Etude critique de la technique de diagnostic. *Bull. Off. Int. Epiz.*, 87, 383-390.
- MOURTON C., BEARZOTTI M., PIECHACZYK M., PAOLUCCI F., PAU B., BASTIDE J. M., KINKELIN P. DE, 1990. Antigenic-capture ELISA for viral haemorrhagic septicaemia virus serotype I. *J. Virol. Methods*, 29, 325-334.
- MULCAHY D., BATTS W. N., 1987. Infectious hematopoietic necrosis virus detected by separation and incubation of cells from salmonid cavity fluid. *Can. J. Fish Aquat. Sci.*, 44, 1071-1075.
- MULCAHY D., PASCHO R. J., JENES C. K., 1983. Titre distribution patterns of infectious hematopoietic necrosis virus in ovarian fluids of hatchery and feral salmon populations. *J. Fish Dis.*, 6, 183-188.
- NEUKIRCH M., 1984. An experimental study of the entry and multiplication of viral haemorrhagic septicaemia virus in rainbow trout, *salmo gairdneri* Richardson, after water-borne infection

- J. Fish Dis., 7, 231-234.
- NEUKIRCH M., 1984. Some aspects of virus shedding by rainbow trout (*Salmo gairdneri*, Rich.) after waterborne infection with viral haemorrhagic septicaemia (VHS) virus Zbl. Bakt. Hyg., 257, 433-438.
- NICHOLSON B. L., HENCHAL E. A., 1978. Rapid identification of infectious pancreatic necrosis virus in infected cell cultures by immunoperoxidase techniques. J. Wild Dis., 14, 465-469.
- NICHOLSON B. L., CASWELL P., 1982. Enzyme-linked immunosorbent assay for identification of infectious pancreatic necrosis virus. J. Clin. Microbiol., 16, 469-472.
- NICHOLSON B., POCHEBIT S., 1981. Antigenic analysis of infectious pancreatic necrosis viruses (IPNV) by neutralization kinetics. Develop. Biol. Standard, 49, 35-41.
- NISHIMURA T., ISHIDA Y., YAMAMOTO S., FUKUDA H., OKAMOTO N., SANO T., 1988. Infectious haematopoietic necrosis: virus titer in the fish bodies, rearing water and feces of artificially infected rainbow trout fry. Fish Pathol., 23, 13-17.
- OKAMOTO N., HEDRICK R. P., FRYER J. L., SANO T., 1983. Antigenic relationships of selected strains of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) and European eel virus. J. Fish Dis., 6, 19-25.
- OLBERDING K. P., FROST J. W., 1975. Electron microscopical observations of the structure of the virus of viral haemorrhagic septicaemia (VHS) of Rainbow trout (*Salmo gairdneri*). J. Gen. Virol., 27, 305-312.
- OLESEN N. J., VESTERGAARD JORGENSEN P. E., 1986. Detection of neutralizing antibody to Egtved virus in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) by plaque neutralization test with complement addition. Appl. Ichthyol., 2, 33-41.
- OLESEN N. J., LORENZEN N., JORGENSEN P. E. V., 1991. Detection of rainbow trout antibody to Egtved virus by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), immunofluorescence (IF) and plaque neutralization test (50 p. 100 PNT). Dis. Aquatic. Organisms., 10, 31-38.
- PIPER D., NICHOLSON N. L., DUNN J., 1973. Immunofluorescent study of the replication of infectious pancreatic necrosis virus in trout and Atlantic salmon cell cultures. Infect. Immun., 8, 249-254.
- RODAK L., POSPISIL Z., TOMANEK J., VESELY T., OBR T., VALICEK L., 1988. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) detection of infectious necrosis virus (IPNV) in culture fluids and tissue homogenates of the rainbow trout, *Salmo gairdneri*, Richardson. J. Fish Dis., 11, 225-235.
- RODRIGUEZ SAINT-JEAN S., VILAS P., PEREZ-PRIETO S., 1991. Detection of infectious pancreatic necrosis in a carrier population of rainbow trout, *Onchorynchus mykiss* (Richardson) by flow cytometry. J. Fish Dis. 14, 545-553.
- RISTOW S. S., ARNZEN J. M., 1989. Development of monoclonal antibodies that recognize a type-2 specific and a common epitope on the nucleoprotein of infectious hematopoietic necrosis virus. J. Aquatic. Animal. Health., 1, 119-125.
- RISTOW S. S., ARNZEN J. M., 1991. Monoclonal antibodies to the glycoprotein and nucleoprotein of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) reveal differences among isolates of the virus by fluorescence, neutralization and electrophoresis. Dis. Aquatic. Org., 11, 105-115.
- SANCHEZ M. C. T., COLL J. M., 1989. La Estructura de las inmunoglobulinas de peces. Inmunología, 8, 47-54.
- SANCHEZ C., DOMINGUEZ J., COLL J., 1989. Immunoglobulin heterogeneity in the rainbow trout, *salmo gairdneri* Richardson. J. Fish Dis., 12, 459-465.
- SANCHEZ C., COLL J. M., DOMINGUEZ J., 1991. One step purification of rainbow trout immunoglobulin. Vet. Immunol. Immunopathol., 27, 383-392.
- SANZ F., COLL J. M., 1990. Mayor eficacia y sensibilidad en el diagnóstico de rabdovirus. Biotecnología, 6, 7-9.
- SANZ F., COLL J. M., 1991a. Diagnóstico de la septicemia hemorrágica viral de los salmónidos. Veterinaria Praxis, 6, 25-32.
- SANZ F., COLL J. M., 1992. Detection of haemorrhagic septicaemia virus of salmonids fishes by the use of an enzyme linked immunosorbent assay containing two non-competitive monoclonal antibodies against early viral nucleoproteins and high sodium chloride concentration., Am. J. Vet. Res. 53, 897-903.
- SANZ F., BASURCO B., BABIN M., DOMINGUEZ J., COLL J. M., 1992. Variability of viral haemorrhagic septicaemia virus as studied with monoclonal antibodies against its structural proteins. J. Fish Dis. (En prensa).

- SCHULTZ C. L., LIDGERDING B. C., MCALLISTER P. E., HETRICK F. M., 1985. Production and characterization of monoclonal antibody against infectious hematopoietic necrosis virus. *Fish Pathol.*, 20, 339-341.
- SCHULTZ C. L., MCALLISTER P. E., SCHILL W. B., LIDGERDING B. C., HETRICK F. M., 1989. Detection of infectious haematopoietic necrosis virus in cell culture fluid using immunoblot assay and biotinylated monoclonal antibody. *Dis. Aquat. Organisms*, 7, 31-37.
- SHORS S. T., WINSTON V., 1989. Neutralizing antibodies for infectious hematopoietic necrosis virus in eggs of steelhead trout (*salmo gairdneri*). *Am. J. Vet. Res.*, 50, 232-234.
- SOBRINO F., ESCRIBANO J. M., COLL J. M., 1989. Diagnóstico de virus por amplificación específica y detección no radiactiva. *Biotechnología*, 5, 8-10.
- SWANSON R. N., GILLESPIE J. H., 1981. An indirect fluorescent antibody test for the rapid detection of infectious pancreatic necrosis virus. *J. Fish Dis.* 4, 309-315.
- THUVANDER A., FOSSUM C., LORENZEN N., 1990. Monoclonal antibodies to salmonid immunoglobulin: characterization and applicability in immunoassays. *Dev. Comp. Immunol.*, 14, 415-423.
- VESTERGAARD JORGENSEN P. E., 1968. Serological identification of Egtved virus (virus of viral haemorrhagic septicaemia of rainbow trout). A preliminary report. *Bull. Off. Int. Epiz.*, 69, 985-989.
- VESTERGAARD JORGENSEN P. E., 1971. Egtved virus: Demonstration of neutralizing antibodies in serum from artificially infected Rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. Fish Res. Bd. Canada*, 28, 875-877.
- VESTERGAARD JORGENSEN P. E., MEYLING A., 1972. Egtved virus: Demonstration of virus antigen by the fluorescence antibody technique in tissue of Rainbow trout affected by Viral Haemorrhagic Septicaemia and in cell cultures infected with Egtved virus. *Archiv. für die Gesamte Virus Froschung*, 36, 115-122.
- VESTERGARD-JORGENSEN P. E., 1972. Egtved virus: antigenic variation in 76 virus isolates examined in neutralization test and by means of the fluorescent antibody technique. *Symp. Zool. Soc. Lond.*, 30, 333-339.
- VESTERGARD-JORGENSEN P. E., 1973. The nature and biological activity of IPN virus neutralizing antibodies in normal and immunized rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Archiv. Für die Gesamte Virus Froschung*, 42, 9-20.
- VESTERGAARD JOGENSEN P. E., 1974. Indirect fluorescent antibody techniques for demonstration of trout viruses and corresponding antibody. *Acta Vet. Scand.*, 15, 198-205.
- WAY K., DIXON P. F., 1988. Rapid detection of VHS and IHN viruses by the enzymelinked immunosorbent assay (ELISA). *J. Appl. Ichthyol*, 4, 182-189.
- WINTON J. R., 1991. Recent advances in detection and control of infections he, matopoietic necrosis virus in Aquaculture. *Annual Review of Fish Dis.*, 1, 83-93.
- WINTON J. R., ARAKAWA C. K., LANNAN C. N., FRYER J. L., 1988. Neutralizing monoclonal antibodies recognize antigenic variants among isolates of infectious hematopoietic necrosis virus. *Dis. Aquatic Organism.*, 4, 199-204.
- WOLF, K., MANN J. A., 1980. Poikilothrmic vertebrate cell lines and viruses. A current listing for species. *In Vitro*, 16, 168-169.
- WOLSKI S. C., ROBERSON B. S., HETRICK F. M., 1986. Monoclonal antibodies to the Sp Strain of infectious pancreatic necrosis virus. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 12, 373-381.
- YOSHIMIZU M., KIMURA T., 1985. A coagglutination test with antibody-sensitized stphylococci for rapid and simple diagnosis of bacterial and viral diseases of fish. *Fish Pathology*, 20, 234-261.
- ZEILLENBERG L. O., JENSEN M. H., ZWILLENBERG H. H. L., 1965. Electron microscopy of the virus of viral haemorrhagic septicaemia of rainbow trout (Egtved virus). *Archiv Fur die Gesamte Virus Froschung*, 17, 1-19.