

# Necrosis pancreática infecciosa: enfermedad emergente en la truiticultura de México

## Infectious pancreatic necrosis: an emerging disease in the Mexican trout culture

Celene Salgado-Miranda\*

---

### Abstract

Infectious pancreatic necrosis (IPN) is an important viral disease of salmonids. In the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) an etiological agent, a birnavirus causes a lethal disease in fry and fingerling. Survivors act as asymptomatic carriers at other life stages, which may shed the etiologic agent, or transmit it vertically to their progeny. Diagnosis of IPN-diseased and detection of infected trouts are important for controlling the spread of the virus. The IPN is worldwide distributed, being recently identified in Mexico. In the present paper the epizootiology, prevention and control of this disease are reviewed in an exhaustive and systematic manner.

**Key words:** INFECTIOUS PANCREATIC NECROSIS , BIRNAVIRUS, SALMONIDS, TROUTS.

### Resumen

La necrosis pancreática infecciosa (NPI) constituye una enfermedad viral importante que afecta a los salmónidos. En la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) el agente etiológico, un birnavirus, causa enfermedad letal en crías y alevines. Los peces que sobreviven actúan como portadores del virus en estadios de edad más avanzados, éstos pueden diseminar el agente causal o transmitirlo de manera vertical a su progenie. La identificación de truchas con NPI o la detección viral en peces infectados es importante para controlar la diseminación del virus. Esta enfermedad, de distribución mundial, ha sido identificada recientemente en México. En el presente trabajo se revisa de manera exhaustiva y sistemática la información relacionada con la epizootiología, prevención y control de dicha enfermedad.

**Palabras clave:** NECROSIS PANCREÁTICA INFECCIOSA, BIRNAVIRUS, SALMÓNIDOS, TRUCHAS.

---

Recibido el 27 de septiembre de 2005 y aceptado el 2 de mayo de 2006.

\*Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México, 50000, Toluca, Estado de México, México, correo electrónico: salgadamiranda@uaemex.mx

## Introduction

**I**nfectious pancreatic necrosis (IPN) is a disease caused by a birnavirus affecting several wild and commercial aquatic organisms.<sup>1</sup> Salmonid species are the most affected, having an important impact in the salmon and trout culture due to a high rate mortality of fry and fingerling. IPN disease is listed in the fish diseases of the International Health Code, World Organization for Animal Health (OIE). For this reason, any IPN outbreak has to be reported.<sup>2</sup>

The epizootiological knowledge of the IPN is relevant for establishing preventive and control strategies against both disease and causative agent.

### Distribution

The IPN and the causative agent (IPNV) has been reported in several countries: Australia,<sup>3</sup> Canada,<sup>4-8</sup> Chile,<sup>9</sup> Denmark,<sup>10</sup> Scotland,<sup>11,12</sup> Spain,<sup>13-15</sup> Finland,<sup>16</sup> France,<sup>17</sup> England,<sup>18,19</sup> Italy,<sup>20</sup> Japan,<sup>21</sup> Norway<sup>22,23</sup> and Switzerland,<sup>24</sup> among others. Based on these reports, IPN is regarded as a worldwide distributed disease.<sup>1</sup>

In Mexico, IPNV was identified in 2001 from US-imported rainbow trout fry.<sup>25,26</sup> In a recent study, the IPNV was isolated from three rainbow trout breeding farms located at Mexico State, Mexico,<sup>27</sup> regarded as the main producer of this fish species.

### Etiology

The causative agent of IPN is a virus belonging to the Birnaviridae family. Other members of this family include infectious bursal disease (IBD) of chickens and X virus of *Drosophila melanogaster*.<sup>28</sup> This birnavirus is single-shelled icosahedrons with characteristic isometric hexagonal profiles and has a diameter of about 60 nm.<sup>29-31</sup> The genome consists of two segment of double-stranded RNA. Genome segment A encoding two structural proteins (VP2 y VP3) and a non-structural protease, while segment B encoding for a RNA polymerase.<sup>31</sup> VP2 protein induces the production of specific-type neutralizing monoclonal antibodies.<sup>32</sup> It is thought that VP2 contains all the epitopes recognized by these antibodies.<sup>33</sup>

The serological classification scheme of Hill and Way<sup>34</sup> recognizes nine different IPNV serovars into the serogroup A. Seven of these serotypes have been identified in IPNV rainbow trout isolates. Serogroup B includes a single serotype represented by the TV-1 archetype isolated from brown trout (*Salmo trutta*) and common carp (*Cyprinus carpio*). Each serotype includes a number of strains that differ in virulence.<sup>35,36</sup> This variation complicates the disease which is little understood.<sup>37</sup>

## Introducción

**L**a necrosis pancreática infecciosa (NPI) es una enfermedad ocasionada por un birnavirus que afecta a varios organismos acuáticos silvestres y de cultivo.<sup>1</sup> Los salmónidos son principalmente afectados, por lo que esta enfermedad tiene un impacto considerable en la salmicultura y truticultura, debido a una elevada mortalidad de crías y alevines. La NPI se encuentra en la lista de enfermedades de peces de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) en su Código Sanitario Internacional para los Animales Acuáticos, por lo que debe ser notificada.<sup>2</sup>

El conocimiento de la epizootología de la NPI es determinante para establecer las estrategias de prevención y control de esta enfermedad, así como del agente causal.

### Distribución

La NPI y el virus causal (VNPI) han sido identificados en varios países: Australia,<sup>3</sup> Canadá,<sup>4-8</sup> Chile,<sup>9</sup> Dinamarca,<sup>10</sup> Escocia,<sup>11,12</sup> España,<sup>13-15</sup> Finlandia,<sup>16</sup> Francia,<sup>17</sup> Inglaterra,<sup>18,19</sup> Italia,<sup>20</sup> Japón,<sup>21</sup> Noruega<sup>22,23</sup> y Suiza,<sup>24</sup> entre otros. Con base en estos informes, la NPI se considera enfermedad de distribución mundial.<sup>1</sup>

En México se identificó el VNPI en 2001 a partir de crías de trucha arco iris provenientes de Estados Unidos de América.<sup>25,26</sup> En un estudio reciente se realizó el aislamiento del VNPI en tres granjas de reproducción de trucha en el Estado de México, México,<sup>27</sup> principal productor de esta especie en el país.

### Etiología

El agente causal de la NPI es un virus de la familia Birnaviridae. Otros miembros de esta familia incluyen el virus de la infección de la bolsa de Fabricio en los pollos y el virus X de *Drosophila melanogaster*.<sup>28</sup> Este birnavirus tiene forma icosaédrica, aproximadamente de 60 nm de diámetro.<sup>29-31</sup> Contiene un genoma compuesto de dos segmentos de ácido ribonucleico (ARN) de doble hebra. El segmento A codifica para dos proteínas estructurales (VP2 y VP3) y una proteasa no estructural, mientras que el segmento B codifica para una polimerasa de ARN.<sup>31</sup> La proteína VP2 estimula la producción de anticuerpos monoclonales neutralizantes de tipo específico,<sup>32</sup> se piensa que contiene todos los epitopos reconocidos por estos anticuerpos.<sup>33</sup>

El esquema de clasificación serológica de Hill y Way<sup>34</sup> reconoce nueve serotipos diferentes del VNPI en el serogrupo A. Siete de estos han sido identificados en aislamientos de trucha arco iris. El serogrupo B incluye un solo serotipo, representado por el arquetipo TV-1, que fue aislado de trucha café (*Salmo trutta*)

## Epizootiology

### Natural and experimental hosts

Salmonids are the most susceptible species under natural conditions.<sup>1</sup> The brook trout (*Salvelinus fontinalis*)<sup>38</sup> is the most susceptible one to lethal effects of IPNV, followed by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*).<sup>39</sup> Also, IPNV has been isolated from arctic char (*Salvelinus alpinus*),<sup>40</sup> brown trout (*Salmo trutta*) and lake trout (*Salvelinus namaycush*).<sup>4,36</sup>

The IPNV has been isolated from important non-salmonid species in marine aquaculture: turbot (*Scophthalmus maximus*),<sup>23,41</sup> sole (*Solea senegalensis*)<sup>42</sup> and Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*).<sup>19,43</sup> Also has been isolated from some fishes as pike (*Esox lucius*),<sup>44</sup> goldfish (*Carasius auratus*), discus fish (*Symphysodon discus*) and bream (*Abramis brama*),<sup>45</sup> among others. IPNV was experimentally inoculated and re-isolated from zebra fish eggs (*Brachydanio rerio*).

Some IPNV cases have been reported in American and European eels (*Anguilla anguilla*). However, the infection in Japanese eel (*Anguilla japonica*) has a greater economic impact.<sup>46</sup>

In summary, the IPNV has been identified in a number of teleosts family fish: *Anguillidae*, *Atherinidae*, *Carangidae*, *Channidae*, *Cichlidae*, *Clupeidae*, *Cobitidae*, *Cyprinidae*, *Gadidae*, *Esocidae*, *Percichthyidae*, *Percidae*, *Pleuronectidae*, *Poeciliidae*, *Salmonidae*, and *Sciaenidae*.<sup>1</sup>

### Transmission, carriers and vectors

Infected fish can transmit the virus by both horizontal and vertical transmission.<sup>1</sup> These fish shed the virus by urine and feces, contributing to the horizontal transmission.<sup>47</sup> In breeding fish, it has been demonstrated that the IPNV is vertically transmitted by viral adsorption to the surface of spermatozooids,<sup>48</sup> or it can be present in the follicular fluid, but not in the non-fertilized eggs.<sup>49</sup>

Bebak *et al.*<sup>50</sup> experimentally determined the IPNV excretion patterns in rainbow trout fry. The time between challenge and excreting, and challenge and signs onset were evaluated. Also the authors estimated the rate of susceptible-excreting fish into a population from inoculated IPNV fry. It was demonstrated that IPNV-infected rainbow trout fry shed the virus two days post-inoculation, and the shedding is increased, and approximately decreased after 12 days post-inoculation. More than 75% of the rainbow trout population was infected in less than a week from the beginning of the viral shedding.

In rotifers (*Brachionus plicatilis*) it has been observed birnavirus lesions associated with an IPNV-

y carpa común (*Cyprinus carpio*). Cada serotipo está compuesto de numerosas cepas que difieren en la virulencia.<sup>35,36</sup> Esta variación hace más compleja la enfermedad, que es poco entendida.<sup>37</sup>

## Epizootiología

### Portadores naturales y experimentales

Los salmónidos son peces principalmente susceptibles de manera natural.<sup>1</sup> La trucha de fontana (*Salvelinus fontinalis*)<sup>38</sup> es la más susceptible a los efectos letales del VNPI, seguida por la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) y el salmón del Atlántico (*Salmo salar*).<sup>39</sup> El VNPI también ha sido aislado a partir de la trucha alpina (*Salvelinus alpinus*),<sup>40</sup> trucha café (*Salmo trutta*) y la trucha de lago (*Salvelinus namaycush*).<sup>4,36</sup>

El VNPI ha sido aislado a partir de peces no salmónidos importantes en la acuicultura marina, como: rodaballos (*Scophthalmus maximus*),<sup>23,41</sup> lenguados (*Solea senegalensis*)<sup>42</sup> y fletán o halibut del Atlántico (*Hippoglossus hippoglossus*).<sup>19,43</sup> También a partir de otros peces como el lucio (*Esox lucius*),<sup>44</sup> pez dorado (*Carasius auratus*), pez disco (*Symphysodon discus*) y brema común (*Abramis brama*),<sup>45</sup> entre otros. De manera experimental, el VNPI fue inoculado y aislado en las ovas del pez cebra (*Brachydanio rerio*).

Se han informado casos de NPI en la anguila americana y europea (*Anguilla anguilla*). Sin embargo, se considera que la infección en la anguila japonesa (*Anguilla japonica*) es de mayor impacto económico.<sup>46</sup>

En resumen, el VNPI se ha identificado en numerosas familias de peces teleosteos, como: *Anguillidae*, *Atherinidae*, *Carangidae*, *Channidae*, *Cichlidae*, *Clupeidae*, *Cobitidae*, *Cyprinidae*, *Gadidae*, *Esocidae*, *Percichthyidae*, *Percidae*, *Pleuronectidae*, *Poeciliidae*, *Salmonidae*, *Sciaenidae*.<sup>1</sup>

### Transmisión, portadores y vectores

Los peces infectados pueden transmitir el virus de manera horizontal y vertical.<sup>1</sup> Estos peces eliminan el virus por medio de la orina y heces, lo cual contribuye a la transmisión horizontal.<sup>47</sup> En peces reproductores, se ha demostrado que el VNPI se transmite de manera vertical mediante la adsorción viral a la superficie de los espermatozoides,<sup>48</sup> o puede estar presente en el líquido folicular, pero no en el interior de las ovas aún no fertilizadas.<sup>49</sup>

Bebak *et al.*<sup>50</sup> determinaron experimentalmente los patrones de excreción del VNPI en crías de trucha arco iris, así como el tiempo entre la exposición y la diseminación del virus, y entre la exposición y la presentación de signos. También estimaron la proporción de peces susceptibles infectados en una población a partir de

like virus. It is likely that invertebrate animals used as living-food for seabream and turbot larvae, could be involved in the viral transmission.<sup>51</sup> Similarly, it has been demonstrated that the freshwater crayfish (*Astacus astacus*) retains the virus in tissues and hemolymph, constantly shedding the virus to the water. Halder and Ahne<sup>52</sup> suggest that these organisms are infected by the consumption of IPNV-infected trouts.

The following shellfish species are regarded as reservoirs of the IPNV: mussels (*Mytilus galloprovincialis*), oysters (*Crassostrea gigas*), periwinkles (*Littorina littorea*), and wild fish as sand eels (*Ammodytes* sp), sprat (*Sprattus sprattus*) and blue whiting (*Micromesistius poutasou*), among others. IPNV has been also isolated from moist fish pellets and marine sediments.<sup>15</sup>

Wild piscivorous birds are regarded as vectors of the IPNV, which can be isolated from feces samples.<sup>53</sup>

### **Signs**

The IPN is a typical disease in early ages of salmonids, causing up to 100% of mortality in fingerlings and first-feeding fry.<sup>54</sup> An experimental study reported a mean cumulative mortality ranging from 84% to 92% in challenged Atlantic salmon fry. The fish mortality started 7 days post-challenge and peaked at 10-12 days.<sup>55</sup> Generally affected fish showed anorexia and rotate about their long axis in a whirling motion with lapses of ataxia. In these fish darkening occurs (hyperpigmentation). Mild to moderate exophthalmia and abdominal distention are common. Also, gills are typically pale and hemorrhages are sometimes present in ventral areas, including the ventral fins. Many emaciated fish trail long, thin, whitish, castlike excretions from the vent.<sup>56</sup>

### **Macroscopic and microscopic findings**

According to necropsy findings, spleen, heart, liver and kidneys of fry are abnormally pale and the digestive tract is almost always devoid of food. Petechiae are observed in some viscera. Sometimes, food residue remains in the gut, the quantity is small and confined to the far distal or rectal portion. Very often the body cavity may contain ascitic fluid. The stomach and anterior intestine contains a clear to milky cohesive mucus, among other findings.<sup>56</sup>

Main lesions found at the histopathology study include: focal coagulative necrosis in pancreas, kidney and intestine. The pancreatic tissue showed degenerative changes, including acinar cell areas, and zymogen granules freeing. Nuclear pyknosis of different sizes are observed. In many cases inflammatory cell infiltration is not evident. In fish that suffered the disease up

los virus diseminados por los peces inoculados. Aquí se demuestra que las crías de trucha infectadas eliminan el virus dos días después de la inoculación, y que la eliminación se incrementa, y disminuye aproximadamente 12 días después de la exposición. Los peces inoculados infectaron a los peces susceptibles dos días después y más de 75% de la población de truchas fue infectada en menos de una semana a partir del comienzo de la eliminación viral.

En rotíferos (*Brachionus plicatilis*) se han observado lesiones virales asociadas con un birnavirus del tipo VNPI. Es posible que estos invertebrados, que se emplean como alimento vivo de larvas y estadios jóvenes de peces como rodaballos y la brema común, puedan estar implicados en la transmisión del virus.<sup>51</sup> De forma similar, se ha demostrado que el cangrejo de río (*Astacus astacus*) retiene el virus en tejidos y hemolinfa, y lo elimina de forma constante en el agua. Halder y Ahne<sup>52</sup> sugieren que estos organismos se infectan con el VNPI a partir del consumo de truchas infectadas.

Las siguientes especies de moluscos se consideran reservorios del VNPI: mejillón azul (*Mytilus galloprovincialis*), ostión japonés (*Crassostrea gigas*) y bigaros (*Littorina littorea*), así como los peces aguacioso (*Ammodytes* sp), espadín (*Sprattus sprattus*) y bacaladilla (*Micromesistius poutassou*), entre otros. El virus también ha sido aislado a partir de alimento comprimido húmedo y sedimento marino.<sup>15</sup>

Las aves silvestres piscívoras son consideradas vectores del virus, el cual puede ser aislado a partir de heces.<sup>53</sup>

### **Signos**

La NPI es una enfermedad típica en edades jóvenes de salmónidos, que puede causar hasta 100% de mortalidad en alevines y crías de primera alimentación.<sup>54</sup> En un estudio experimental reciente se informó de mortalidad de 84% a 92% en crías de salmón, la cual comenzó al séptimo día posterior a la inoculación y alcanzó el pico máximo entre los días 10 y 12.<sup>55</sup> Generalmente los peces afectados muestran anorexia y nadan de forma irregular (nado en sacacorchos con lapsos de ataxia). Estos peces cambian a un color oscuro (hiperpigmentación) y presentan exoftalmia moderada y distensión abdominal. También se observan pálidas las branquias y hemorragias en la zona ventral, incluidas las aletas. Los peces se observan delgados y con "heces colgantes" de color blanquecino.<sup>56</sup>

### **Hallazgos macroscópicos y microscópicos**

De acuerdo con los principales hallazgos en la necropsia en crías, bazo, corazón, hígado y riñones se obser-

to two years before the histology study, hypertrophy of Langerhans' islets with abundant fibrosis were found.<sup>57</sup> In cases of pancreatic lesions, also acute enteritis featured by necrosis and sloughing of the epithelium are observed. In the intestinal lumen, catarrhal whitish exudate is associated with the disease. Inclusion bodies are not observed in affected cells.<sup>57</sup> In many cases, the renal tissue has small focal degenerative changes. In fish that were infected during early ages, abundant rounding up of epithelial cells with karyorhectic nuclei was found. This finding suggest that they can be viral replication sites in carrier fish; however, it has not been confirmed.<sup>58</sup>

## **Diagnosis**

The procedure for IPNV diagnosis, recommended by the OIE,<sup>59</sup> is based on the isolation of IPNV in susceptible cell lines (Figure 1), and further identification by serological techniques by immunofluorescent test,<sup>59</sup> neutralization test<sup>60</sup> and ELISA.<sup>61,62</sup> Diagnosis of clinical outbreaks is based on histology and immunological evidence of the IPNV in infected tissues. These cases are confirmed by the IPNV isolation and immunological identification of the virus.<sup>59</sup> Due to insufficient knowledge of the serological responses of fish to IPNV infection, the detection of fish antibodies to IPNV has not been accepted by the OIE (2003) as routine tests.<sup>54</sup>

Detection of IPNV in cell lines is consistent and simple, particularly in cell lines from homologous species. It is due to: 1) the virus is present in high level titers in the tissues; 2) viral isolation could be positive from non-diseased fish; 3) viral isolation could be positive from any viral phase; 4) two to three weeks are required for isolation and identification of the agent, which is not a critical issue for presentation of a epizootic outbreak, and 5) high sensitivity and easy observable cytopathic effect. Cell lines used for the IPNV isolation include: RTG-2 (rainbow trout gonad), CHSE-214 (chinook salmon embryo) and BF-2 (bluegill fry).<sup>63,64</sup>

Currently, some methods have been developed for detecting IPNV by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) technique.<sup>65,72</sup> However, sensitivity of this technique has not been greater than the cell culture. Hence, viral isolation and serological confirmation of the virus are regarded as the choice procedures for the IPNV identification.

## **Prevention and control**

Current preventive methods are based on the onset of control and hygiene practices during rearing of salmonids, avoiding introduction or importation

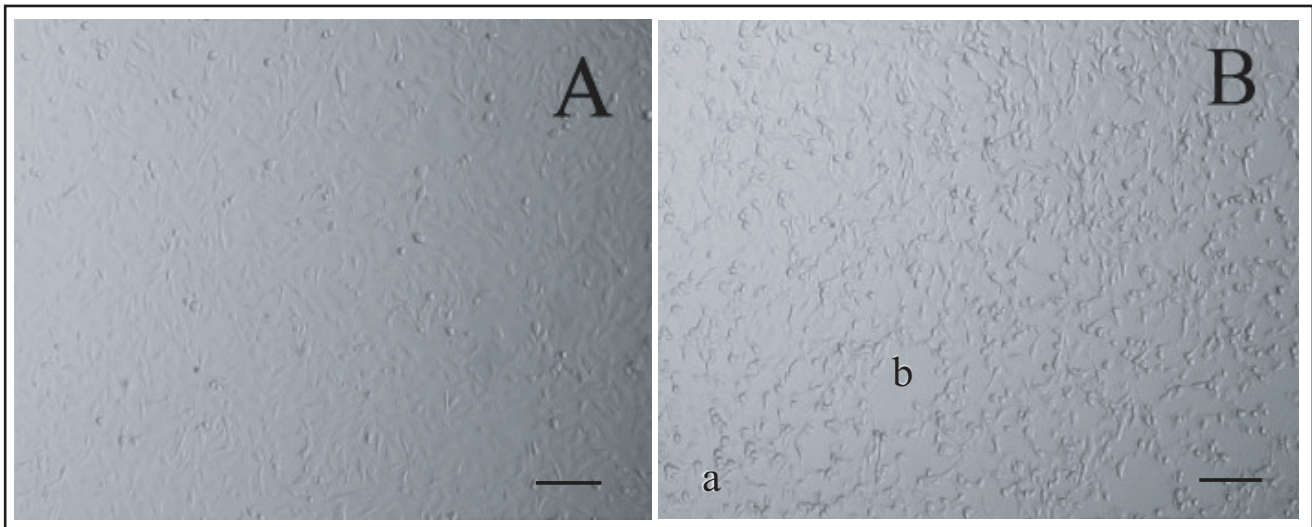
van pálidos, y la mayoría de las veces no se encuentra alimento en el tracto digestivo. Se observan hemorragias petequiales en vísceras. En algunas ocasiones, se encuentra alimento en pequeñas cantidades, confinado en la parte distal y recto del intestino. Es frecuente observar líquido ascítico en la cavidad abdominal. En estómago e intestino anterior se puede observar un moco lechoso cohesivo, entre otros hallazgos.<sup>56</sup>

Las lesiones principales halladas en el estudio histopatológico incluyen focos de necrosis coagulativa en páncreas, riñón e intestino. El tejido pancreático se ve degenerado, incluso en las áreas acinares, con liberación de los gránulos de zimógeno. Los núcleos de las células acinares se observan picnóticos y de tamaños variables. En muchos casos no se aprecia infiltración de células inflamatorias. En peces que sufrieron la enfermedad hasta dos años antes del estudio histológico, el tejido de los islotes se encontró hipertrófico y con abundante tejido fibroso.<sup>57</sup> En los casos de lesiones pancreáticas, se observa enteritis aguda, caracterizada por necrosis y desepitelización. En el lumen intestinal, se halla exudado catarral blanquecino, frecuentemente asociado con esta enfermedad. No se observan cuerpos de inclusión en las células afectadas.<sup>57</sup> En muchos casos, el tejido renal contiene focos pequeños con cambios degenerativos. En peces adultos que sufrieron infección a edad temprana, en intestino se encontró abundantes células epiteliales con núcleos cariorréticos. Este hallazgo sugiere que pueden ser sitios de replicación viral en los portadores, pero esto no se ha confirmado.<sup>58</sup>

## **Diagnóstico**

El procedimiento para la identificación de la NPI, recomendado por la OIE,<sup>59</sup> se basa en el aislamiento del VNPI en cultivo celular (Figura 1), seguido por la identificación inmunológica de los aislamientos mediante pruebas de inmunofluorescencia,<sup>59</sup> seroneutralización<sup>60</sup> y ELISA.<sup>61,62</sup> El diagnóstico de casos clínicos generalmente se basa en la histología y en la evidencia inmunológica del VNPI en los tejidos infectados. Estos casos se confirman mediante el aislamiento e identificación inmunológica del virus por medio de dichas pruebas.<sup>59</sup> Las pruebas serológicas de identificación de anticuerpos contra el VNPI en peces infectados no han sido reconocidas aún por la OIE (2003), debido al insuficiente conocimiento de la respuesta inmune humoral de los peces a este virus.<sup>54</sup>

La detección del VNPI en líneas celulares es consistente y simple, principalmente en líneas procedentes de especies homólogas. Esto se debe a que 1) el virus está presente en títulos elevados en los tejidos; 2) el aislamiento se puede realizar a partir de animales no enfermos; 3) no hay fase en la que el virus no pueda



**Figura 1:** Microfotografías de la línea celular CHSE-214. A. Cultivo celular con 90% de confluencia, sin inoculación viral, mostrando la morfología celular normal. B. Efecto citopático provocado por el VNPI en la línea celular CHSE-214, dos días posteriores a la inoculación. Se observan células redondeadas *a*) y pérdida de la monocapa celular *b*). Barra = 100  $\mu$ m.

**Figure 1:** Microphotographs of CHSE-214 cell culture. A. Uninfected control at approximately 90% confluence showing normal cellular morphology. B. Cytopathic effect induced by IPNV in the CHSE-214 cell culture at two days post-inoculation. Rounded cells *a*) and monolayer loss are observed *b*). Bar = 100  $\mu$ m.

of fertilized eggs or fish from IPNV-infected breeding trouts.<sup>73</sup> Also, the use of fish-free freshwater (for example, spring water), particularly IPNV-carrier fish, reduces the risk of infection. However, in Mexican trout farms, this condition is not always possible. As mentioned above, Salgado-Miranda<sup>27</sup> carried out the IPNV isolation from three rainbow trout breeding farms located at Mexico State. Obtained results indicated a possible horizontal transmission throughout the water supply from a farm where a previous IPN outbreak in fry was recorded. In these cases, treatment of supplied water could decrease the risk of an IPN outbreak and other infectious agents. Liltved *et al.*<sup>74</sup> experimentally exposed live cultures of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*, *Vibrio anguillarum*, *V. salmonicida*, *Yersinia ruckeri* and IPNV to ozone or ultraviolet (UV) irradiation at 9°-12°C. The four bacteria tested were inactivated by 99.99% (4 log reductions in viable count) within 180 seconds at residual ozone concentrations of 0.15-0.20 mg/L. The IPNV was inactivated within 60 seconds at residual ozone concentrations of 0.10 a 0.20 mg/L. Similarly, the four bacteria tested were inactivated by 99.9% (5 log reductions in viable count) at a UV dose of 2.7 m Ws/cm<sup>2</sup> at room temperature. IPNV was much more resistant to UV irradiation than the bacteria. An average UV dose of 122 m Ws/cm<sup>2</sup> was required for 99.9% (3 log) reduction in virus titer. However, it has to be considered that ozone low residual levels (0.010 a 0.20 mg/L) have also caused mortalities in trout recirculating systems.<sup>75</sup> A concentration of 40 ppm available chlo-

ser aislado; 4) el tiempo requerido para el aislamiento e identificación del agente es de dos a tres semanas, lo cual no es crítico para la presentación de una epizootia, y 5) alta sensibilidad y efecto citopático fácilmente observable. Las líneas celulares empleadas para el aislamiento del VNPI incluyen la RTG-2 (*rainbow trout gonad*), CHSE-214 (*chinook salmon embryo*) y BF-2 (*bluegill fry*).<sup>63,64</sup>

Actualmente se han desarrollado varios métodos de detección por medio de la técnica de transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR, por sus siglas en inglés: *reverse transcriptase-polymerase chain reaction*).<sup>65-72</sup> Sin embargo, la sensibilidad de esta técnica no ha sido mayor a la del cultivo celular, por lo que el aislamiento del virus y la confirmación serológica son los procesos de elección para la identificación del VNPI.

### **Prevención y control**

Los métodos de prevención actualmente se basan en la instrumentación de políticas de control y en prácticas de higiene en la crianza de los salmónidos, para evitar la introducción o importación de ovas fertilizadas o peces provenientes de lotes de reproductores portadores de VNPI.<sup>73</sup> Asimismo, el uso y suministro de agua libre de peces (por ejemplo, manantial), particularmente de posibles portadores del virus, reduce el riesgo de infección. Sin embargo, bajo las condiciones de la truiticultura en México, esta condición no es posible. Como ya se mencionó, Salgado-Miranda<sup>27</sup>

rine was required to experimentally inactivate  $10^{7.5}$  TCID<sub>50</sub> of IPNV/ml in 30 minutes.<sup>76</sup> Similarly, a concentration of 35 ppm of active iodine was required to completely inactivate  $10^{6.6}$  TCID<sub>50</sub> of IPNV/ml in the same time.<sup>76</sup> Other study, where several disinfectants were tested, 25 ppm of iodine was required to inactivate IPNV, infectious haematopoyetic necrosis virus (IHNV) and viral haemorrhagic septicemia (VHS).<sup>77</sup> It is important to highlight that IHNV and VHS are exotic infectious agents in Mexico.

For controlling IPN in breeding farms, infected fish and its offspring (eggs, fingerling and fry) have to be sacrificed. IPNV transmission by fertilized eggs can occur in spite of iodine treatment.<sup>78</sup> Propagation of IPNV-free stocks monitored by viral isolation during several years, has been a good strategy for the control of IPN in breeding farms.<sup>79</sup>

In areas where IPN is enzootic, it is recommended, during an outbreak, to decrease the density of the affected population, reducing the impact on the total mortality. A study showed that interaction between fish density and number of infected fish, affected significantly the mortality parameter.<sup>80</sup> However, there are some disagreements about it.<sup>81</sup>

Up to date, highly effective IPNV-inactivated vaccines do not exist.<sup>82,83</sup> Treatment with formalin or  $\beta$ -propiolactone for use in vaccines, completely inactivated IPNV, but caused a slight reduction in antigenicity up to 50%.<sup>84</sup> An active vaccine containing an IPNV non-pathogenic strain, normal trout serum-sensitive, did not confer protection in experimental challenged fish.<sup>85</sup> In Norway, both inactivated and recombinant vaccines are widely used.<sup>86</sup> The recombinant vaccine, the first one licensed for using in fish, express the VP2 sequence in *Escherichia coli* and induce specific IPNV antibodies.<sup>87</sup>

As it happens in other viral diseases, there is no treatment for the IPN. Several antiviral compounds inhibits the *in vitro* replication in cell culture; for example, ribavirin,<sup>88</sup> pyrazofurin<sup>89</sup> and 5-ethynyl-1- $\beta$ -D-ribofuranosylimidazole-4-carboxamide (EICAR),<sup>90</sup> among other compounds. Research on EICAR as an antiviral compound showed good results in experimentally IPNV-infected rainbow trout.<sup>91</sup> The effect of the administration of lysozyme (KLP-602) in the feed of IPNV experimentally infected rainbow trout, has been also evaluated.<sup>92</sup> Cumulative mortality was lower in fish fed on dietary treatment containing lysozyme (30%), compared with untreated fish (65%). Based on the significantly increase of all the immunological parameters, these authors refer that the lysozyme modulated the cellular and humoral defense mechanisms after suppression induced by IPNV. Also, a selected trout strain resistant to natural infection by this virus has been reported.<sup>93</sup>

realizó el aislamiento del VNPI en tres granjas reproductoras de trucha arco iris del estado de México, México. Los resultados indicaron una posible transmisión horizontal a partir del agua de suministro proveniente de otra granja de truchas en donde se presentó un brote previo de NPI en crías. En estos casos, el tratamiento del agua de suministro puede disminuir el riesgo de NPI, así como de otros agentes infecciosos. De manera experimental, Liltved *et al.*<sup>74</sup> expusieron suspensiones de *Aeromonas salmonicida* subespecie *salmonicida*, *Vibrio anguillarum*, *V. salmonicida*, *Yersinia ruckeri* y VNPI en varios tipos de agua tratada con ozono y radiación ultravioleta (UV) a 9°-12°C. Las cuatro bacterias fueron inactivadas en 99.99% (una reducción en cuatro logaritmos del conteo inicial de bacterias viables) a una concentración de ozono residual de 0.15-0.20 mg/L en un lapso de 180 segundos. Mientras que el VNPI fue inactivado a una concentración de ozono residual de 0.10 a 0.20 mg/L en un lapso de 60 segundos. De forma similar, las cuatro bacterias fueron inactivadas en 99.999% (una reducción en cinco logaritmos del conteo inicial de bacterias viables) a dosis de UV de 2.7 m Ws/cm<sup>2</sup> a temperatura ambiente. El VNPI fue más resistente a la radiación UV que las bacterias. Se requirió una dosis promedio de 122 m Ws/cm<sup>2</sup> para reducir 99.9% del título viral (tres logaritmos). Sin embargo, se debe considerar que las concentraciones residuales bajas de ozono (0.010 a 0.20 mg/L) pueden ocasionar la mortalidad de truchas en sistemas de producción con recirculación de agua.<sup>75</sup> También de manera experimental, se determinó que una concentración de 40 ppm de cloro disponible en agua durante 30 minutos inactivó completamente un título de VNPI de  $10^{7.5}$  TCID<sub>50</sub>/mL.<sup>76</sup> De forma similar, una concentración de 35 ppm de yodo inactivó completamente un título de  $10^{6.6}$  TCID<sub>50</sub>/ml en el mismo tiempo.<sup>76</sup> En otro estudio, donde se probaron varios desinfectantes, se encontró que una concentración de 25 ppm de yodo inactivó el VNPI, así como el virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (IHNV) y el virus de la septicemia hemorrágica viral (VHS).<sup>77</sup> Cabe señalar que los virus IHNV y VHS se consideran agentes exóticos en México.

Para el control de la NPI en granjas de reproductores, tanto los peces infectados como su progenie (ovas, alevines y crías) deben ser sacrificados. La transmisión del VNPI en ovas fertilizadas puede ocurrir aún con la desinfección con yodo.<sup>78</sup> Una estrategia que dio buenos resultados en el control de esta enfermedad en granjas de reproductores fue la propagación de lotes libres del virus, identificados por medio del aislamiento viral durante varios años.<sup>79</sup>

En áreas donde la NPI es enzootica, durante un brote de esta enfermedad es recomendable la lotificación de la población afectada para disminuir el

As Håstein *et al.*<sup>94</sup> pointed out, future national and international aquaculture regulations for the establishment of preventive and control strategies of infectious diseases include: adoption of standardized control methods, suitable infrastructures development, and a deeper comprehension of the epizootiology of aquatic organism diseases.

## Conclusion

IPNV is a birnavirus affecting mainly salmonid species, being the rainbow trout the most susceptible species. In Mexico, isolation and identification of this infectious agent from rainbow trout was recently reported. Neither a treatment nor totally effective vaccines against this disease are available, being the preventive and control measures of great importance. Introduction into farms of eggs, fish and water supply free of IPNV are the main preventive strategy. These also constitute the most important risk factors in spreading of this disease.

## Acknowledgments

The collaboration in structure design and critical review of the manuscript by Dr. Edgardo Soriano Vargas, CIESA-FMVZ-UAEM, is greatly acknowledged.

## Referencias

1. Reno PW. Infectious pancreatic necrosis and associated aquatic birnaviruses. In: Woo PTK, Bruno DW, editors. Fish Diseases and Disorders. Viral, Bacterial and Fungal Infections. London: CABI Publishing, 1999:1-55.
2. Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). Código Sanitario Internacional para los Animales Acuáticos. Francia:OIE, 2004.
3. Crane MSJ, Smith PH, Williams LM, Hyatt AD, Eaton LM, Gould A *et al.* First isolation of an aquatic birnavirus from farmed and wild fish species in Australia. *Dis Aquat Organ* 2000;43:1-14.
4. Mackelvie RM, Artsob H. Infectious pancreatic necrosis virus in young salmonids of the Canadian maritime provinces. *J Fish Res Board Can* 1969;26:3259-3262.
5. Macdonald RD, Moore AR, Souter BW. Three new strains of infectious pancreatic necrosis virus isolated in Canada. *Can J Microbiol* 1983;29:137-141.
6. Lecomte J, Arella M, Berthiaume L. Comparison of polyclonal and monoclonal antibodies for serotyping infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) strains isolated in eastern Canada. *J Fish Dis* 1992;15:431-436.
7. Bruneau NN, Thorburn MA, Stevenson RMW. Occurrence of *Aeromonas salmonicida*, *Renibacterium salmoninarum*, and infectious pancreatic necrosis virus in Ontario salmonid populations. *J Aquat Anim Health* 1999;11:350-357.

impacto sobre la mortalidad total, ya que un estudio mostró que la interacción que se da entre el número de peces infectados con VNPI y la densidad poblacional, afectan significativamente este parámetro.<sup>80</sup> Sin embargo, existen discrepancias al respecto.<sup>81</sup>

A la fecha no existe una vacuna inactivada disponible altamente efectiva contra el VNPI.<sup>82,83</sup> El tratamiento del virus con formalina o  $\beta$ -propiolactona para su uso en vacunas, inactivó el virus completamente, pero redujo la antigenicidad hasta en 50%.<sup>84</sup> Una vacuna activa que incluyó una cepa no patogénica del VNPI, sensible a suero normal de trucha, no confirió protección al desafío experimental.<sup>85</sup> En Noruega, las vacunas inactivadas y recombinantes son ampliamente usadas.<sup>86</sup> La vacuna recombinante, la primera con licencia para administrarse en peces, expresa la secuencia de la VP2 en *Escherichia coli* e induce la producción de anticuerpos específicos contra el VNPI.<sup>87</sup>

Como sucede con otras enfermedades virales, no existe tratamiento para la NPI. Varios compuestos antivirales inhiben la replicación *in vitro* en cultivo celular; por ejemplo, la ribavirina,<sup>88</sup> la pirazofurina<sup>89</sup> y el 5-etinil-1- $\beta$ -D-ribofuranosilimidazol-4-carboximida (EICAR),<sup>90</sup> entre otros. De manera experimental, la investigación sobre el EICAR como compuesto antiviral en truchas arco iris infectadas con VNPI, mostró buenos resultados.<sup>91</sup> También se ha evaluado el efecto de la administración de lisozima (KLP-602) en el alimento de truchas infectadas de manera natural con el VNPI.<sup>92</sup> La mortalidad acumulada en el grupo con tratamiento fue de 30%, mientras que en el grupo no tratado fue de 65%. Con base en el incremento significativo de todos los parámetros inmunológicos, los autores mencionan que la lisozima modula los mecanismos de defensa humoral y celular después de la supresión inducida por el VNPI. Asimismo, se ha informado sobre la selección de una línea de truchas resistente de manera natural a la infección por este virus.<sup>93</sup>

Como lo mencionan Håstein *et al.*,<sup>94</sup> las necesidades futuras en la legislación nacional e internacional en materia de acuicultura para el establecimiento de estrategias de prevención y control de enfermedades infecciosas, son la adopción de métodos de control estandarizados, la creación de infraestructuras adecuadas y una comprensión más profunda de la epizootología de las enfermedades de los organismos acuáticos.

## Conclusión

El VNPI es un birnavirus que afecta principalmente a los salmónidos, siendo la trucha arco iris la especie más susceptible. En México, recientemente se informó del aislamiento e identificación de este agente infeccioso



8. Bruneau NN, Thorburn MA, Wilson J, Meek A. Hatchery-level predictive values for infectious pancreatic necrosis virus and *Aeromonas salmonicida* in Ontario, Canada. *Prev Vet Med* 2001;48:129-141.
9. McAllister PE, Reyes X. Infectious pancreatic necrosis virus: isolation from rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, imported into Chile. *J Fish Dis* 1984;7:319-322.
10. Verstergård-Jørgensen P, Bregnballe F. Infectious pancreatic necrosis in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) in Denmark. *Nord Vet* 1969;21:142-148.
11. Ball HJ, Munro ALS, Ellis A, Elson KGR, Hodgkins W, McFarlane IS. Infectious pancreatic necrosis in rainbow trout in Scotland. *Nature* 1971;234:417-418.
12. Murray AG, Busby CD, Bruno DW. Infectious pancreatic necrosis virus in Scottish Atlantic salmon farms, 1996-2001. *Emerg Infect Dis* 2003;9:455-460.
13. Ledo A, Lupiani B, Dopazo CP, Toranzo AE, Barja JL. Fish viral infectious in northwest of Spain. *Microbiología* 1990;6:21-29.
14. Rodriguez S, Vilas MP, Perez SI. Prevalence of infectious pancreatic necrosis virus on salmonid fish farms in Spain. *J Aquat Anim Health* 1994;6:138-143.
15. Cutrin JM, Oliviera JG, Barja JL, Dopazo CP. Diversity on infectious pancreatic necrosis virus strains isolated from fish, shellfish and other reservoirs in northwestern Spain. *Appl Environ Microbiol* 2000;66:839-843.
16. Keranen AL, Koski P, Kulonen K, Kommonen Ek, Neuvonen E. Occurrence of infectious fish diseases in fish farms in northern Finland. *Acta Vet Scand* 1992;33:161-167.
17. De Kinkelin P, Besse P. Une épidémie de Nécrose Pancréatique dans les salmonicultures françaises. *Bull Off Int Epiz* 1966;65:999-1010.
18. Bucke D. Attempts to assess the occurrence of IPN in fish farms in England and Wales. *Bull Off Int Epiz* 1977;87:429-433.
19. Rodger HD, Frerichs GN. Clinical infectious pancreatic necrosis virus infection in farmed halibut in the United Kingdom. *Vet Rec* 1997;140:401-402.
20. Quaglio F. Infectious disease from birnavirus with particular reference to infectious pancreatic necrosis of salmonids. *Riv Ital Acquacol* 1989;24:167-179.
21. Hosono N, Suzuki S, Kusuda R. Evidence for relatedness of Japanese isolates of birnaviruses from marine fish to IPNV. *J Fish Dis* 1994;17:433-437.
22. Håstein T, Krogsrud J. Infectious pancreatic necrosis first isolation of virus from fish in Norway. *Acta Vet Scand* 1976;17:109-111.
23. Mortensen SH, Evensen Ø, Rødseth OM, Hjeltnes BK. The relevance of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in farmed Norwegian turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture* 1993;115:243-252.
24. Knuesel R, Senger H, Wahli T. A survey of viral diseases in farmed and feral salmonids in Switzerland. *J Fish Dis* 2003;26:167-182.
25. Ortega C, Vega F, Salgado-Miranda C, Monras M, Enriquez R. Isolation of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Mexico. Book of Abstracts of the European Association

a partir de trucha arco iris. No existen tratamiento ni vacunas totalmente efectivas para esta enfermedad, por lo que las medidas de prevención y control son de gran importancia. La introducción de ovas y peces, así como el suministro de agua libre de VNPI, constituyen la principal estrategia en la prevención de la NPI, ya que son los principales factores de riesgo en la diseminación de esta enfermedad.

## Agradecimientos

Se agradece al Dr. Edgardo Soriano Vargas, CIESA-FMVZ-UAEM, su colaboración en la estructuración y revisión crítica del documento.

- 
- of Fish Pathologists. Tenth International Conference "Disease of Fish and Shellfish". 2001 September 9-14. Trinity College Dublin, Ireland. Aarhus, Denmark. Scotland, UK: European Association of Fish Pathologists. 2001.
  26. Ortega SC, Montes de Oca R, Groman D, Yason C, Nicholson B, Blake S. Case report: viral infectious pancreatic necrosis in farmed rainbow trout from Mexico. *J Aquat Anim Health* 2002;14:305-310.
  27. Salgado-Miranda C. Prevalencia del virus de la necrosis pancreática infecciosa en granjas de reproducción de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) en el Estado de México (tesis de maestría). Toluca (Edo. de México) México: Universidad Autónoma del Estado de México, 2004.
  28. Dobos P, Hill BJ, Hallett R, Kells DTC, Becht H, Teninges D. Biophysical and biochemical characterization of five animal viruses with bisegmented double-stranded RNA genomes. *J Virol* 1979;32:593-605.
  29. Cerini CP, Malsberger RG. Morphology of infectious pancreatic necrosis virus. *Ann N Y Acad Sci* 1965;126:315-319.
  30. Cohen J, Poinard A, Scherrer R. Physico-chemical and morphological features of infectious pancreatic necrosis virus. *J Gen Virol* 1973;21:485-498.
  31. Dobos P. Size and structure of the genome of infectious pancreatic necrosis virus. *Nucleic Acids Res* 1976;3:1903-1924.
  32. Nicholson BL. Use of monoclonal antibodies in identification and characterization of fish viruses. *Annu Rev Fish Dis* 1993;3:241-257.
  33. Caswell-Reno P, Reno PW, Nicholson BL. Monoclonal antibodies to infectious pancreatic virus: analysis of viral epitopes and comparison of different isolates. *J Gen Virol* 1986;67:2193-2205.
  34. Hill BJ, Way K. Serological classification of infectious pancreatic necrosis (IPN) virus and other aquatic birnaviruses. *Annu Rev Fish Dis* 1995;5:55-77.
  35. Hill BJ. Infectious pancreatic necrosis virus and its virulence. In: Roberts R, editors. *Microbial Diseases of Fish*. London:Blackwell, 1982:91-114.
  36. Silim A, Elazhary SY, Lagacé A. Susceptibility of trouts

- of different species and origins to various isolates of infectious pancreatic necrosis virus. *Can J Fish Aquat Sci* 1982;39:1580-1584.
37. Bruslind LD, Reno PW. Virulence comparison of three buhl-subtype isolates of infectious pancreatic necrosis virus in brook trout fry. *J Aquat Anim Health* 2000;12:301-315.
  38. Elazhary MASY, Lagage A, Cousineau G, Roy RS, Berthiaume L, Paulhus P *et al.* Outbreak of infectious pancreatic necrosis in yearling brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *J Fish Res Board Can* 1976;33:2621-2625.
  39. Sadasiv EC. Immunological and pathological responses of salmonids to infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). *Ann Rev Fish Dis* 1995;5:209-223.
  40. McAllister PE, Bebak J, Wagner B. Susceptibility of arctic char to experimental challenge with infectious haematopoietic necrosis virus (IHNV) and infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). *J Aquat Anim Health* 2000;12:35-43.
  41. Novoa B, Barja JL, Figueras A. Entry and sequential distribution of an aquatic birnavirus in turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture* 1995;131:1-9.
  42. Perez-Prieto S, Garcia-Rosado E, Rodriguez S, Castro D, Borrego JJ. Antigenic properties and experimental transmission to several fish species of a marine birnavirus isolated from sole (*Solea senegalensis*). *Vet Microbiol* 2001;82:11-25.
  43. Gahlawat SK, Munro ES, Ellis AE. A non-destructive test for detection of IPNV-carriers in Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* (L.). *J Fish Dis* 2004;27:233-239.
  44. Ahne W. Some properties of an IPN-virus isolated from pike (*Esox lucius*). *Bull Off Int Epizoot* 1977;87:417-418.
  45. Adair BM, Ferguson HW. Isolation of infectious pancreatic necrosis (IPN) virus from non-salmonid fish. *J Fish Dis* 1981;4:69-76.
  46. Sano T, Okamoto N, Nishimura T. A new viral epizootic of *Anguilla japonica* Temminck and Schlegel. *J Fish Dis* 1981;4:127-139.
  47. Billi JL, Wolf K. Quantitative comparison of peritoneal washes and feces for detecting infectious pancreatic necrosis (IPN) virus in carrier brook trout. *J Fish Res Board Can* 1969;26:1459-1465.
  48. Mulcahy D, Pascho RJ. Adsorption to fish sperm of vertically transmitted fish virus. *Science* 1984;225:333-335.
  49. Wolf K, Quimby MC, Bradford A. Egg-associated transmission of IPN virus of trouts. *Virology* 1963;21:317-321.
  50. Bebak J, McAllister PE, Smith G. Infectious pancreatic necrosis virus: transmission from infectious to susceptible rainbow trout fry. *J Aquat Anim Health* 1998;10:287-293.
  51. Comps M, Menu B, Breuil G, Bonami JR. Viral infectious associated with rotifer mortalities in mass culture. *Aquaculture* 1991;93:1-7.
  52. Halder M, Ahne W. Freshwater crayfish *Astacus astacus* – a vector for infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). *Dis Aquat Organ* 1988;4:205-209.
  53. McAllister PE, Owens WJ. Recovery of infectious pancreatic necrosis virus from the faeces of wild piscivorous birds. *Aquaculture* 1992;106:227-232.
  54. Wolf K, Quimby MC. Infectious pancreatic necrosis: clinical and immune response of adult trouts to inoculation with live virus. *J Fish Res Board Can* 1969;26:2511-2516.
  55. Santi N, Vakharia VN, Evensen O. Identification of putative motifs involved in the virulence of infectious pancreatic necrosis virus. *Virology* 2004;322:31-40.
  56. Wolf K. Fish viruses and fish virus diseases. New York: Cornell University Press, Ithaca, 1988.
  57. McKnight IJ, Roberts RJ. The pathology of infectious pancreatic necrosis. I. The sequential histopathology of the naturally occurring condition. *Br Vet J* 1976;132:76-85.
  58. Smail DA, McFarlane L, Bruno DW, McVicar AH. The pathology of an IPN-Sp sub-type (Sh) in farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L., post-smolts in the Shetland Isles, Scotland. *J Fish Dis* 1995;18:631-638.
  59. World Organisation for Animal Health. Diagnostic Manual for Aquatic Animal Diseases. France:OIE. 2003.
  60. Lientz JC, Springer JE. Neutralization test of infectious pancreatic necrosis virus with polyvalent antiserum. *J Wildl Dis* 1973;9:120-124.
  61. Dixon PF, Hill BJ. Rapid detection of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *J Gen Virol* 1983;64:321-330.
  62. Davis FJ, Laidler LA, Perry PW, Rossington D, Alcock R. The detection of infectious pancreatic necrosis virus in asymptomatic carrier fish by an integrated cell-culture and ELISA technique. *J Fish Dis* 1994;17:99-110.
  63. Wolf K, Quimby MC. Established eurythermic line of fish cells *in vitro*. *Science* 1962;135:1065-1066.
  64. Kelly RK, Souter BW, Miller HR. Fish cells lines: comparisons of CHSE-214, FHM, and RTG-2 in assaying IHN and IPN viruses. *J Fish Res Board Can* 1978;35:1009-1011.
  65. Rimstad E, Krona R, Hornes E, Olsvik Ø, Hyllseth B. Detection of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) RNA by hybridization with an oligonucleotide DNA probe. *Vet Microbiol* 1990;23:211-219.
  66. Pryde A, Melvin WT, Munro ALS. Nucleotide sequence analysis of the serotype-specific epitope of infectious pancreatic necrosis virus. *Arch Virol* 1993;129:287-293.
  67. Lopez-Lastra M, Gonzalez M, Jashes M, Sandino AM. A detection method for infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) based on reverse transcription (RT) - polymerase chain reaction (PCR). *J Fish Dis* 1994;17:269-282.
  68. Blake SL, Schill WB, McAllister PE, Lee MK, Singer JT, Nicholson BL. Detection and identification of aquatic birnaviruses by PCR assay. *J Clin Microbiol* 1995;33:835-839.
  69. Alonso M, Rodriguez S, Perez-Prieto SI. Nested PCR improves detection of infectious hematopoietic necrosis virus in cells coinfecting with infectious pancreatic necrosis virus. *J Virol Methods* 1999;81:1-9.
  70. Williams K, Blake S, Sweeney A, Singer JT, Nicholson

- BL. Multiplex reverse transcriptase PCR assay for simultaneous detection of three fish viruses. *J Clin Microbiol* 1999;37:4139-4141.
71. Rodriguez S-JS, Borrego JJ, Perez-Prieto SI. Comparative evaluation of five serological methods and RT-PCR assay for the detection of IPNV in fish. *J Virol Methods* 2001;97:23-31.
  72. Taksdal T, Dannevig BH, Rimstad E. Detection of infectious pancreatic necrosis (IPN)-virus in experimentally infected Atlantic salmon parr by RT-PCR and cell culture isolation. *Bull Eur Assoc Fish Pathol* 2001;21:214-219.
  73. Morley RS. A model for the assessment of the animal disease risk associated with the importation of animals and animal products. *Rev Sci Tech* 1993;12:1055-1092.
  74. Liltved H, Hektoen H, Efraimsson H. Inactivation of bacterial and viral fish pathogens by ozonation or UV irradiation in water of different salinity. *Aquat Engineer* 1995;14:107-122.
  75. Noble AC, Summerfelt S. Diseases encountered in rainbow trout cultured in recirculating systems. *Appl Environ Microbiol* 1996;6:65-92.
  76. Desautels D, MacKellvie RM. Practical aspects of survival and destruction of infectious pancreatic necrosis virus. *J Fish Res Board Can* 1975;32:523-531.
  77. Amend DF, Pietsch JP. Virucidal activity of two iodophors to salmonid viruses. *J Fish Res Board Canada* 1972;29:61-65.
  78. Bullock GL, Rucker RR, Amend D, Wolf K, Stuckey HM. Infectious pancreatic necrosis: transmission with iodine-treated and nontreated eggs of brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *J Fish Res Board Can* 1976;33:1197-1198.
  79. Wolf K, Quimby MC, Carlson CP, Bullock GL. Infectious pancreatic necrosis: selection of virus-free stock from a population of carrier trout. *J Fish Res Board Can* 1968;25:383-391.
  80. Bebak-Williams J, McAllister PE, Smith G, Boston R. Effect of fish density and number of infectious fish on the survival of rainbow trout fry, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), during epidemics of infectious pancreatic necrosis. *J Fish Dis* 2002;25:715-726.
  81. Smith G, Bebak J, McAllister PE. Experimental infectious pancreatic necrosis infections: propagative or point-source epidemic? *Prev Vet Med* 2000;47:221-241.
  82. Dorson M. Vaccination against infectious pancreatic necrosis. In: Ellis AE, editor *Fish Vaccination*. London: Academic Press, 1988:163-203.
  83. Gudding R, Lillehaug A, Evensen Ø. Recent developments in fish vaccinology. *Vet Immunol Immunopathol* 1999;72:203-212.
  84. Dixon PF, Hill BJ. Inactivation of infectious pancreatic necrosis virus for vaccine use. *J Fish Dis* 1983;6:399-409.
  85. Dorson M. Vaccination trials of rainbow trout fry against infectious pancreatic necrosis. *Bull Off Int Epizoot* 1977;87:405-406.
  86. Frost P, Ness A. Vaccination of Atlantic salmon with recombinant VP2 of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV), added to a multivalent vaccine, suppresses viral replication following IPNV challenge. *Fish Shellfish Immunol* 1997;7:609-619.
  87. Christie KE. Immunization with viral antigens: infectious pancreatic necrosis. *Dev Biol Stand* 1997;90:191-199.
  88. Migus DO, Dobos P. Effect of ribavirin on the replication of infectious pancreatic necrosis virus in fish cell cultures. *J Gen Virol* 1980;47:47-57.
  89. Jashes M, Gonzalez M, Lopez-Lastra M, De Clercq E, Sandino A. Inhibitors of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) replication. *Antiviral Res* 1996;29:309-312.
  90. Jashes M, Mlynarz G, De Clercq E, Sandino AM. Inhibitory effects of EICAR on infectious pancreatic necrosis virus replication. *Antiviral Res* 2000;45:9-17.
  91. Moya J, Pizarro H, Jashes M, De Clercq E, Sandino AM. *In vivo* effect of EICAR (5-ethynyl-1-β-D-ribofuranosylimidazole-carboxamide) on experimental infected rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) fry with infectious pancreatic necrosis virus. *Antiviral Res* 2000;48:125-130.
  92. Siwicki AK, Morand M, Klein P, Kiczka W. Treatment of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) disease using dimerized lysozyme (KLP-602). *J Appl Ichthyol* 1998;14:229-232.
  93. Okamoto N, Tayama T, Kawanobe M, Fujiki N, Yasuda Y, Sano T. Resistance of a rainbow trout strain to infectious pancreatic necrosis. *Aquaculture* 1993;117:71-76.
  94. Håstein T, Hill BJ, Winton JR. Successful aquatic animal disease emergency programmes. *Rev Sci Tech* 1999;18:214-227.