

# Zakaźna anemia łososi

Aleksandra Ruszczyk

z Zakładu Wirusologii, Mykologii i Immunologii Katedry Nauk Przedklinicznych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej w Warszawie

**Infectious salmon anaemia. Ruszczyk A., Division of Virology, Mycology and Immunology, Department of Preclinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Warsaw Agricultural University.**

**Infectious salmon anaemia (ISA) is an emerging disease posing threat to Atlantic salmon industry in Europa and both Americas. Although it has never been reported in Poland, ISA is one of the three fish diseases that are subjected for eradication in our country. In this article, we discuss the aspects of etiology, prevalence, pathogenesis, clinical and anatomopathological signs, diagnostic methods and prevention of this economically important orthomyxovirus infection in fish.**

**Keywords: ISA, ISAV, orthomyxoviruses, Atlantic salmon.**

W Unii Europejskiej istotne choroby zwierząt pochodzących z kultur wodnych umieszczone zostały na trzech listach i objęte wytycznymi zawartymi w dyrektywach unijnych (1). Zakaźna anemia łososi (ISA – infectious salmon anaemia) znajduje się na liście I Dyrektywy Rady z 28 stycznia 1991 r. oraz na liście chorób ryb Międzynarodowego Urzędu do spraw Epizootii – OIE (1,2). Choroba ta przyczyniła się do ogromnych strat, które w Szkocji w latach 1998–99 oszacowane zostały na 32 mln \$, gdy w 1999 r. w Norwegii na 11 mln \$, a w Kanadzie na 14 mln \$ (3). W Polsce hodowla łososia atlantyckiego związana jest przede wszystkim z produkcją wylęgu, narybku i smoltów, które służą do restytucji populacji tych ryb w wodach polskich. Dotychczas nie odnotowano żadnego przypadku ISA w naszym kraju, jednakże w związku z dostosowywaniem prawa polskiego do obowiązującego w pozostałych krajach członkowskich Unii Europejskiej, ISA obok zakaźnej posocznicy krwotocznej (VHS – viral haemorrhagic septicaemia) i zakaźnej martwicy układu krwiotwórczego ryb łososiowatych (IHN – infectious haematopoietic necrosis) od 1 maja 2004 r. podlega w Polsce obowiązkowi zwalczania (4).

## Charakterystyka wirusa zakaźnej anemii łososi

Czynnikiem etiologicznym ISA jest wirus zakaźnej anemii łososi – ISAV, który należy do tej samej co wirusy grypy rodziny *Orthomyxoviridae*. Chociaż jego pokrewieństwo z wirusami grypy jest znacznie większe niż z innymi ortomyksowirusami, występujące pomiędzy nimi istotne różnice zadecydowały o utworzeniu dla niego odrębnego rodzaju *Isavirus* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

[ICTVdb/Ictv/fs\\_ortho.htm#Genus5](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/fs_ortho.htm#Genus5)). Proces przyłączania cząsteczek ISAV, ich wnikania do komórek oraz replikacji i uwalniania dojrzałych wirionów przebiega podobnie jak u wirusów grypy. Wiriony łączą się z receptorami na powierzchni komórek, a następnie dochodzi do fuzji ich błon w kwaśnym środowisku endosomów (5). ISAV replikuje w jądrze komórki, wykorzystując jako startery 8-18 nukleotydowe fragmenty RNA posiadające na końcu 5' metylacyjną „czapeczkę”, które zapoczątkowują proces transkrypcji vRNA na mRNA (6, 7). Dojrzałe wiriony uwalniają się z zakażonych komórek poprzez pączkowanie (8, 9). Widoczne w mikroskopie elektronowym cząsteczki ISAV mają kształt kulisty, jajowaty lub pleomorficzny, o średnicy około 100–140 nm i maksymalnej długości 700 nm. Wiriony składają się z osłonki wyposażonej w 10 nm, glikoproteinowe wypustki o grzybobodobej morfologii, białko macierzy tworzące warstwę tuż pod osłonką wirusa oraz wewnętrznych ziarnistości, które są najprawdopodobniej spiralnie skręconymi cząsteczkami rybonukleoproteiny (RNP) tworzącymi nukleokapsyd (8, 9, 10).

Pomimo kilku prób scharakteryzowania wewnętrznej struktury wirionu, nie zaobserwowano występowania w nim, tak typowego dla wirusów grypy, upakowanego lub częściowo odwiniętego nukleokapsydu o helikalnej symetrii (10). Genom ISAV stanowi pojedynczą nić RNA o ujemnej polarności i całkowitej długości 14,5 tys. p.z. (par zasad), na którą składa się 8 segmentów o wielkości 1–2,3 tys. p.z. każdy (11). Na końcach 3' i 5' poszczególnych segmentów znajdują się homologiczne sekwencje umożliwiające tworzenie struktury „rączki od patelni”, która odgrywa istotną rolę w procesie replikacji oraz stabilizacji segmentów genomu (7). Świadczy to o wy-

korzystywaniu podobnego do występującego u wirusów grypy mechanizmu zapoczątkowującego proces transkrypcji RNA. Mimo że dokładna rola wielu białek produkowanych przez ISAV pozostaje wciąż niewyjaśniona, wiadomo już, że organizacja jego genomu różni się znacznie od innych przedstawicieli rodziny *Orthomyxoviridae*. Segment 1 jest jedynym z najbardziej konserwatywnych genów ISAV, który najprawdopodobniej koduje podjednostkę PB2 polimerazy (12). Ciekawe jest to, że większość różnic na poziomie aminokwasów tego białka zlokalizowana jest w pobliżu końca aminowego, który w przypadku wirusa grypy odpowiedzialny jest za łączenie się z podjednostką PB1. W związku z tym zmienność tego obszaru może być związana ze zmianami w białku PB1 (12). Produktem segmentu 2 jest podjednostka PB1 polimerazy, która posiada motyw występujący we wszystkich RNA-zależnych polimerazach. To właśnie analiza sekwencji tego segmentu pozwoliła na wstępne przyporządkowanie ISAV do rodziny *Orthomyxoviridae* (13). Segment 3 koduje nukleoproteinę (NP), która może być odpowiedzialna za indukcję odpowiedzi immunologicznej, gdyż reaguje *in vitro* z anty-ISAV poliklonalnymi przeciwciałami króliczymi (14, 15). U wirusów grypy niewielka ilość tego białka transportowana jest na powierzchnię osłonki i rozpoznawana przez limfocyty T cytotoksyczne. Segment 4 koduje kwasową podjednostkę polimerazy (PA), gdy w przypadku segmentu 5 sugerowanym produktem jest białko fuzyjne (16, 17). Jednym z najlepiej poznanych białek ISAV jest hemaglutynina mająca jednocześnie aktywność esteraazy (HE), która jest produktem segmentu 6 (17, 18, 19). Zarówno segment 7, jak i 8 kodują po dwa białka o nierozstrzygniętej ostatecznie funkcji (11, 20, 21). Badania przeprowadzone przez Bieringa i wsp. wykazały, że białka kodowane przez segment 7 nie reagują z przeciwciałami poliklonalnymi, w związku z tym mogą być białkami niestrukturalnymi (NS1 i NS2), gdy ulegające ekspresji *in vitro* białka kodowane przez segment 8 reagują swoiście z przeciwciałami poliklonalnymi, co wskazuje na to, że mogą to być najmniejsze z głównych białek strukturalnych, prawdopodobnie białka macierzy: M1 i M2 (20). Jednocześnie Ritchie i wsp. twierdzą, że segment 7 może kodować dwa białka macierzy: M1 i M2 (21).

W cząsteczkach ISAV stwierdzono obecność 4 głównych białek strukturalnych: nukleoproteiny (NP), glikoproteiny będącej prawdopodobnie białkiem fuzyjnym, hemaglutyniny (HE) oraz białka macierzy (M) o masie cząsteczkowej odpowiednio 66, 50, 42, i 22 kDa (17). Niezwykle istotna z punktu widze-

nia patogenezę zakaźnej anemii lososi jest hemaglutynina będąca jedną z dwóch glikoprotein ISAV. Mimo że występuje ona co najmniej jako dimer, najprawdopodobniej nie ulega proteolitycznej aktywacji i w związku z tym nie wykazuje właściwości fuzyjnych, które mogą być związane z innym białkiem powierzchniowym (17, 18). HE wykazuje zarówno aktywność związaną z przyłączaniem wirionów do receptorów na powierzchni komórek, jak i z ich niszczeniem (17). Hemaglutynuje ona erythrocyty kilku gatunków ryb, w tym: lososia i dorsza atlantyckiego, pstrąga tęczowego, a także konia, jednocześnie nie hemaglutynując erythrocytów troci wędrownej oraz niektórych ssaków i ptaków (10, 22). ISAV jest w stanie uwolnić się z powierzchni zaglutynowanych erythrocytów z wyjątkiem erythrocytów lososia atlantyckiego. Odbywa się to dzięki enzymowi o aktywności niszczącej receptory, który ma charakter acetylasteryazy hydrolizującej 4-O-acetylowy kwas sialowy (10, 23). Dokładna analiza występowania i rozmieszczenia kwasu sialowego w różnych komórkach lososia byłaby pomocna w lepszym zrozumieniu tropizmu tkankowego wirusa (23).

Hemaglutynina ISAV składa się ze znajdującego się wewnątrz wirionu ogona zawierającego koniec karboksylowy, dwóch obszarów hydrofobowych, z których jeden przecina osłonkę wirusa oraz leżącego na zewnątrz obszaru hydrofilowego (24). Niezwykle istotny z punktu widzenia wirulencji poszczególnych szczepów wydaje się obszar hiperzmienny (HPR – highly polymorphic region) genu HE, który koduje podstawę domeny zewnętrznej hemaglutyniny znajdującej się tuż za osłonką wirusa. Jego zmienność wynikać może z presji spowodowanej koniecznością adaptacji wirusa zakażającego komórki różnych gatunków ryb. HPR kodować może dwa miejsca glikozylacji, których obecność lub brak u poszczególnych szczepów ISAV zależy od długości sekwencji tego obszaru (25). Jak do tej pory, nie udało się ocenić wpływu różnic w glikozylacji HE na zachowanie się różnych szczepów ISAV, chociaż w badaniach Mjaalanda i wsp. szczepy, które miały dwa miejsca glikozylacji osiągały najwyższe miano w zakażonej nimi hodowli komórkowej SHK-1 (25). Na podstawie różnic w obrębie sekwencji obszaru HPR wyizolowane do tej pory szczepy ISAV podzielono na 13 różnych grup. HPRO to grupa, do której zaliczony został szczep ISAV wyizolowany od wolno żyjącego lososia atlantyckiego, nie wykazującego objawów klinicznych choroby. HPR tego szczepu jest najdłuższym ze wszystkich do tej pory zsekwencjonowanych, gdy pozostałe powsta-

ją w wyniku delecji w obrębie tego obszaru. W związku z tym prawdopodobne jest, że szczepy patogenne powstają właśnie na drodze mutacji w obszarze HPR hemaglutyniny ISAV (25, 26). Niektórzy badacze sugerują związek pomiędzy różną wrażliwością linii komórkowych na zakażenie ISAV a zmiennością w obrębie genu HE. Griffiths i wsp. stwierdzili, że zmiany w obrębie końca 3' HE jednego ze szczepów ISAV zmieniają siłę przyłączania wirusa do receptora, jednakże Kibenge i wsp., nie wykazali jasnej współzależności pomiędzy zachowaniem wirusa w hodowli komórkowej a zmiennością sekwencji w genie HE (19, 27).

Hemaglutynina wirusów grypy stanowi podstawowy antygen indukujący produkcję przeciwciał neutralizujących, a porównanie sekwencji tego genu umożliwia tak istotną w dochodzeniu epidemiologicznym analizę filogenetyczną różnych szczepów grypy. U ssaków presja humoralnej odpowiedzi immunologicznej gospodarza jest dla wirusów grypy ważnym mechanizmem selekcyjnym, stymulującym ucieczkę wirusa przed odpornością obecną w populacji w wyniku przebycia wcześniejszych zakażeń lub szczepień. W przeciwieństwie do wirusów grypy gen HE ISAV nie wykazuje dużej zmienności w obszarze znajdującym się najbardziej zewnętrznie, który narażony jest na kontakt z przeciwciałami (25). W przypadku lososi poziom odporności na zakażenia ISAV jest bardzo niski lub żaden, ponieważ szczepionka antyISAV nie jest używana w Europie, a kontakt pomiędzy poszczególnymi pokoleniami ryb jest minimalny. W związku z tym udział selekcji szczepów ISAV, stymulowanej obecnymi w populacji ryb przeciwciałami, ma najprawdopodobniej marginalne znaczenie. Analiza filogenetyczna fragmentu 5' genu HE 70 szczepów ISAV oraz segmentów 2 i 8, wykazała istnienie dwóch grup, z których jedna składa się z izolatów pochodzących z Ameryki Północnej, zaś druga – z Europy (26, 28). Dodatkowo, szczepy pochodzące z Europy podzielić można na trzy różne grupy odzwierciedlające rozmieszczenie geograficzne oraz czas izolacji szczepów (26). Większość różnic pomiędzy szczepami europejskimi dotyczy obszaru HPR, gdy różnice pomiędzy szczepami kanadyjskimi i europejskimi rozłożone są równomiernie w całej sekwencji (18). Jednocześnie przy użyciu 4 króliczych surowic poliklonalnych stwierdzono występowanie 2 głównych grup antygenowych: amerykańskiej i europejskiej, które odpowiadają genogrupom opracowanym na podstawie analizy sekwencji genu HE (19). Analiza filogenetyczna sekwencji segmentu 2 i 8 szczepów ISAV pochodzących z Chile i Nowego Brunswi-

ku w Kanadzie wykazała, że są one ze sobą blisko spokrewnione (29). Co ciekawe, analiza sekwencji segmentu 8 szczepów wyizolowanych od lososia atlantyckiego z Nowej Szkocji w Kanadzie wykazała 99% homologię tego fragmentu pomiędzy szczepami z Nowej Szkocji a szczepami z Europy, gdy jedynie 89% homologii ze szczepami z Nowego Brunswiku (30). Może to świadczyć o tym, że szczepy z Nowego Brunswiku uległy dryftowi genetycznemu w stosunku do pozostałych szczepów charakterystycznych dla całego Atlantyku. Mimo że segmenty 2 i 8 szczepów z Nowej Szkocji są homologiczne ze szczepami z Europy, jednakże istnieją pomiędzy nimi różnice funkcjonalne: szczepy z Nowej Szkocji nie wywołują objawów klinicznych u zakażonych hodowanych lososi atlantyckich i nie powodują efektu cytopatycznego w żadnej linii komórkowej (30).

## Występowanie

Zakaźną anemię lososi stwierdzono po raz pierwszy w 1984 r. w Norwegii (31). Od tego czasu choroba pojawiła się w Kanadzie (1996 r. w Nowym Brunswiku i w 1998 r. w Nowej Szkocji), w 1998 r. w Szkocji, w 2000 r. na Wyspach Owczych oraz w 2001 r. w USA, powodując wysoki procent śmiertelności wśród hodowanego lososia atlantyckiego – *Salmo salar* (29, 32, 33, 34). W 1999 r. występowanie tej choroby przebiegającej z nieznacznie jednak odmiennym obrazem klinicznym i anatomopatologicznym, stwierdzono po raz pierwszy w Chile, u innego niż losos atlantycki gatunku ryb lososiowatych – pacyficznego lososia kiżuczka – *Oncorhynchus kisutch* (29). Był to pierwszy, i jak do tej pory ostatni przypadek wystąpienia zakaźnej anemii lososi na półkuli południowej. Interesujące jest to, że przeprowadzone przez Rollanda i wsp. próby eksperymentalnego zakażenia lososi pacyficznego: kety (*O. keta*), czawczy (*O. tshawytscha*), kiżuczka (*O. kisutch*) oraz pstrąga stalogłowego (*O. mykiss*) wirusem ISA wykazały, że są one wrażliwe na zakażenie, nie dochodzi u nich jednak do wystąpienia objawów klinicznych choroby (35). Mimo że ISA rozwija się u eksperymentalnie zakażonego, trzymanego w wodzie słodkiej stadium „par” lososia atlantyckiego, w warunkach naturalnych choroba pojawia się przede wszystkim w gospodarstwach zasilanych lub z dopływem wody słonej (36). To właśnie słona woda jest prawdopodobnie głównym źródłem wirusa, który jest w stanie przetrwać w niej przez co najmniej 20 godzin w temperaturze 6°C (37, 38, 39). Czynnikiem zwiększającym ryzyko wystąpienia choroby są: lokalizacja gospodarstwa w odległości bliższej niż 5 km

od innych potencjalnie zakażonych gospodarstw lub zakładów przetwórstwa rybnego, zwłaszcza jeśli używana w nich woda nie poddawana jest odpowiednim zabiegom dezynfekcyjnym oraz zakup smoltów łososia pochodzących z kilku różnych wylęgarni (37). Dodatkowo działanie czynników stresogennych, takich jak kąpiele przeciwpasożytnicze i inne zabiegi lecznicze, aktywuje zakażenie u nosicieli wirusa (2). Nie bez znaczenia jest również pora roku, gdyż ISA notowano najczęściej od maja do czerwca i w listopadzie, kiedy choroba (również wywołana eksperymentalnie) ma powolny przebieg (31). Przeniesienie wirusa z gospodarstwa do gospodarstwa może wynikać z wykonywania czynności farmerskich, o czym świadczy obecność ISAV w wodzie, która służy jako balast w łodziach kursujących pomiędzy farmami (38).

Występowanie ISAV stwierdzono w populacji dziko żyjących łososi atlantyckich oraz troci wędrownej (*Salmo trutta m. trutta*) i pstrąga potokowego (*Salmo trutta m. fario*) w słynnych i słodkich wodach Europy (40). Wyizolowany od nich wirus należy najprawdopodobniej do szczepów niepatogennych, które namnażając się w komórkach gospodarza nie wywołują jednocześnie objawów chorobowych. W przypadku kiedy nie można doszukać się związku pomiędzy kolejnymi ogniskami choroby, dziko żyjące ryby mogą być źródłem zakażenia łagodnym szczepem ISAV, który w wyniku delecji w obszarze HPR hemaglutyniny ulega mutacji do szczepu patogenego (26). Czynnikiem wpływającym na pojawienie się tych mutacji może być zmiana gospodarza oraz częsta transmisja wirusa w zagęszczonej populacji ryb hodowanych. Ponadto obecność sekwencji genu ISAV u łososia hodowanego, u którego nie wystąpiły objawy ISA sugeruje, że w niektórych przypadkach adaptacja niepatogennego wirusa poprzez mutację, a nie zakażenie już patogenym szczepem, decyduje o pojawieniu się choroby (25, 30). Niestety nie ma żadnych danych literaturowych na temat transmisji ISAV od ryb hodowanych do wolno żyjących oraz na temat śmiertelności wywołanej ISA w populacji ryb dzikich.

## Patogeneza

Wirus wnika najprawdopodobniej przez skrzelę i/lub jamę gębową oraz uszkodzoną skórę. Jednym z przypuszczalnych wektorów są wszy morskie z gatunku *Lepeophtherius salmonis* i *Caligus elongatus*, które są w stanie przenosić wirusa pomiędzy chorymi a zdrowymi osobnikami (39). Zakażenie ma miejsce drogą horyzontalną. Pomimo że płyn jajnikowy jest zakaźny, zakażenie drogą

wertykalną (transowarialnie) jest mało prawdopodobne (41). Po zakażeniu eksperymentalnym poprzez kąpiel ryb wirus pojawia się w ciągu 2 godzin w skrzelach, a w ciągu 24 godzin w sercu i nerce. W przypadku zakażenia od przebywających w jednym zbiorniku dootrzewnowo zakażonych ryb (cohabitation, współprzebywanie) ISAV pojawia się w skrzelach i sercu 5 dni po umieszczeniu ryb zdrowych z zakażonymi, gdy 13–15 dnia po zakażeniu można go wykryć za pomocą RT-PCR niemal we wszystkich narządach wewnętrznych (wątroba, nerki, śledziona, jelita) oraz sercu, skrzelach i mięśniach (42). Po wnikięciu wirus namnaża się intensywnie w śródbłonku naczyń krwionośnych i wsierdza, a także w leukocytach nerki głowowej, serca, wątroby i krwi obwodowej (6, 9, 43, 44). Badania eksperymentalne wykazały, że zakażone ryby sięją wirusa z kałem, moczem i śluzem skórny, co najmniej na tydzień przed pojawieniem się objawów klinicznych (45). W przeciwieństwie do innych ortomyksowirusów ISAV może powodować nosicielstwo u zakażonych nim troci wędrownej, łososia atlantyckiego oraz pstrąga tęczowego (*O. mykiss*), które stanowią jego rezerwuar, sięjąc wirusa do wody przez długi okres (30, 45, 46, 47, 48, 49).

## Zmiany kliniczne i anatomopatologiczne

Zakaźna anemia łososi, jak sama nazwa wskazuje, przebiega zwykle z niedokrwistością, której towarzyszy spadek wartości hematokrytu nawet poniżej 5% (norma 35–40), zwiększona liczba erytroblastów we krwi obwodowej oraz leukocyto- i trombocytopenia. Typowe objawy kliniczne i anatomopatologiczne towarzyszące ostrej postaci zakaźnej anemii łososi to letarg, wysadzenie gałek ocznych, wybroczyny w przedniej komorze oka, powiększenie obrysu brzusznej części ciała, obrzęk wątroby, która zmienia barwę na ciemnobrązową czy nawet czarną, obrzęk przedniego odcinka przewodu pokarmowego i śledziony oraz ogniskowe wybroczyny w tłuszczu narządowym (31, 44, 50). W preparatach histopatologicznych zmiany dotyczą głównie wątroby i w początkowych etapach choroby (hematokryt około 25%) charakteryzują się obrzękiem i rozszerzeniem naczyń sinusoidalnych, zwyrodnieniem komórek śródbłonka tych naczyń, a w późniejszych stadiach (hematokryt 25–15%) tworzeniem przestrzeni wypełnionych krwią przypominających plamicę wątrobową (*peliosis hepatis*). Przy wartości hematokrytu 10% zmiany w wątrobie nasilają się i stanowią wyspy składające się z hepatocytów ulegających degenera-

cji i martwicy krwotocznej (50, 51). Martwica wątroby spowodowana jest niedokrwieniem wywołanym zaburzeniami w przepływie krwi (51). Jednymi z pierwszych zmian, które można zaobserwować w mikroskopie elektronowym zarówno w wątrobie, jak i śledzionie ryb zakażonych ISAV, są powiększone sinusoidalne makrofagi fagocytujące erythrocyty pojawiające się w śledzionie 4, a w wątrobie 18 dnia po eksperymentalnym, dootrzewnowym zakażeniu (51, 52). Czasami postawienie właściwej diagnozy utrudnia przewlekły przebieg ISA z objawami takimi, jak żółta wątroba, wybroczyny w skórze i pęcherzu pławnym oraz obrzęk torebek łuski (31, 50).

W ostatnich latach coraz częściej pojawiają się doniesienia o występowaniu nietypowych zmian klinicznych i anatomopatologicznych towarzyszących zakażeniu ISAV. Łososi atlantyckie ze stwierdzoną ISA w Nowym Brunzwicku, Kanadzie, charakteryzowały się bladymi skrzelami, ogniskowymi i plamistymi wybroczynami w mięśniach oraz otrzewnej trzewnej i ściennej. Badanie histopatologiczne wykazało zastój krwi w nerkach, ostrą, wielogniskową martwicę kanalików nerkowych oraz nasiloną hemolizę i fagocytozę erythrocytów w śledzionie i nerce (32). W związku z tym, że w niektórych przypadkach ISA obserwuje się zmiany głównie w nerkach nazywana jest ona czasami zespołem krwotocznych nerek (HKS – haemorrhagic kidney syndrome; 32). Równie nietypowy przebieg choroby obserwowano w Chile, gdzie zakażeniu ISA towarzyszyło żółte zabarwienie podstawy płetw i jamy ciała, blade skrzelę, niedokrwistość z hematokrytem poniżej 10%, blada wątroba i pęcherzyk żółciowy oraz niewielki obrzęk śledziony (29).

Pierwsze śnięcia ryb zakażonych dootrzewnowo ISAV pojawiają się w ciągu 12–24 dni (w 24 godziny po wystąpieniu objawów klinicznych), w zależności od dawki wirusa, a u ryb zakażonych przez współprzebywanie – w około 33 dni po umieszczeniu ryb zdrowych z zakażonymi (53, 54). Śnięcia ryb w ostrym przebiegu choroby trwają około 2–3 tygodni i sięgają od kilku do 100% obsady, gdy ryby starsze wykazują mniejszą śmiertelność niż młodsze. Czasami pojawiają się one stopniowo, a ich liczba wzrasta w miarę rozprzestrzeniania choroby w całym gospodarstwie, co może trwać nawet do 12 miesięcy. Uważa się, że ISAV wykazuje względnie niską zakaźność i zdarza się, że występowanie ISA w gospodarstwie ogranicza się do jednej lub dwóch sadzy, w których trzymane są ryby. Powody, dla których choroba może przebiegać w różny sposób, nie są do końca wyjaśnione, jednakże jest to najprawdopodobniej związane z czynnikami środowi-

**Tabela 1. Kryteria rozpoznawania zakaźnej anemii łososi na podstawie zmian anatomopatologicznych, histopatologicznych i hematologicznych (wg OIE)**

|                                   |   |
|-----------------------------------|---|
| <b>Zmiany anatomopatologiczne</b> | 1) ciemna wątroba, ewentualnie żółta z punktowymi wybroczynami lub blada,<br>2) blade skrzela i serce<br>3) płyn w jamie ciała i obrzęk śledziony<br>4) zwykle pojawiają się smugowate wybroczyny w tłuszczu narządowym<br>5) czasami ciemne zabarwienie przedniego odcinka przewodu pokarmowego                                      |
| <b>Zmiany histopatologiczne</b>   | 1) wieloogniskowa, krwotoczna martwica wątroby<br>2) obrzęk, rozszerzenie i przerwanie ciągłości śródbłonki naczyń sinusoidalnych wątroby<br>3) martwica kanalików nerkowych i/lub obrzęk komórek śródbłonki naczyń sinusoidalnych, wybroczyny śródmiąższowe<br>4) obrzęk naczyń sinusoidalnych w śledzionie i fagocytoza erytrocytów |
| <b>Zmiany hematologiczne</b>      | 1) hematokryt poniżej 10%<br>2) leukopenia z limfo- i trombocytopenią<br>3) w rozmazach krwi widoczne ulegające wakuolizacji zmienione erytrocyty oraz erytoblasty z jądrem o nieregularnym kształcie   |

skowymi, takimi, jak pora roku czy wahania temperatury, dawką wirusa oraz z wrażliwością gospodarza. Rola, jaką może odgrywać tutaj wirus pozostaje niewyjaśniona, choć niektórzy badacze sugerują, że jest ona marginalna, jako że zakażając ryby tym samym szczepem uzyskali zarówno ostrą, jak i przewlekłą postać choroby (42).

### Odpowiedź immunologiczna

Niewiele wiadomo na temat przebiegu odpowiedzi immunologicznej w czasie zakażenia ISAV. Badania Falka i wsp. wykazały, że 18 dnia po dootrzewnowym zakażeniu obserwować można liczne Ig-pozytywne komórki (limfocyty B) obecne w śledzionie oraz nerce głowowej zakażonych ryb (52). Przeciwciała wykrywane w teście ELISA pojawiają się w 6 tygodni po zakażeniu (55). Surowica ozdrowieńców, a także ryb zakażonych przez współprzebywanie zawiera przeciwciała neutralizujące, które są najprawdopodobniej związane ze znacznie mniejszą wrażliwością tych ryb na ponowne zakażenie (56, 57). Tymczasem badania przeprowadzone przez Josepha i wsp. wykazały, że obecność przeciwciał neutralizujących zwiększa namnażanie ISAV *in vitro* w hodowli komórkowej SHK-1 pochodzącej z makrofagów nerki głowowej łososia atlantyckiego (58). Najprawdopodobniej ISAV, łącząc się z przeciwciałami wnika do makrofagów poprzez obecne na ich powierzchni receptory Fc dla IgM (58). Ciekawym, choć niestety niewyjaśnionym zjawiskiem jest zwiększona przeżywalność łososi atlantyckich, które zostały zakażone ISAV w trakcie ostrego zakażenia wywołanego wirusem zakaźnej martwicy trzustki (IPNV – in-

fectious pancreatitis necrosis virus; 59). Autorzy sugerują, że odporność na ISAV związana jest z bliżej nieokreślonymi (interferon?) czynnikami antywirusowymi, których produkcja stymulowana jest przez wcześniejsze zakażenie IPNV.

### Diagnostyka

Według OIE diagnostyka oparta na objawach klinicznych i anatomopatologicznych musi składać się z typowych zmian makroskopowych, histopatologicznych i hematologicznych – tab. 1 (60). Ponadto obecność wirusa powinna zostać potwierdzona za pomocą jednej z metod, takich jak: RT-PCR, izolacja we wrażliwej hodowli komórkowej lub odczyn immunofluorescencji. Z istniejących do tej pory metod diagnostycznych zakaźnej anemii łososi najbardziej czuła wydaje się RT-PCR, po raz pierwszy opracowana dla fragmentu segmentu 8 ISAV przez Mjaalanda i wsp. w 1997 r. i zaakceptowana przez OIE jako jedna z oficjalnych metod do diagnostyki zakażeń tym wirusem (11, 46, 60, 61). W związku ze zmiennością genetyczną pomiędzy szczepami ISAV niezwykle istotny wpływ na jakość tej metody ma odpowiednie dobranie starterów i warunków amplifikacji (54, 62). Startery FA3/RA3 dla segmentu 8 amplifikowały wszystkie wyizolowane do tej pory szczepy, gdy startery 991V/1605L dla segmentu 2 nie identyfikują izolatów z Nowego Brunswiku (30). W badaniach przeprowadzonych przez Kibenge i wsp. okazało się, że izolacja wirusa była dużo czulszą metodą w stosunku do użytego przez nich RT-PCR. Autorzy uważają jednak, że może to być związane z mniejszą ilością materiału po-

branego do RT-PCR w stosunku do izolacji (54). Uzyskane wyniki mogą wynikać również z tego, że wirusa izolowano z tkanek łososi zakażonych eksperymentalnie szczepami ISAV zaadaptowanymi wcześniej do hodowli komórkowej. Opracowana ostatnio przez Munir i wsp. metoda real time RT-PCR jest 100 razy bardziej czuła w stosunku do konwencjonalnego RT-PCR i jeśli badania terenowe potwierdzą jej efektywność będzie ona doskonałym narzędziem do identyfikacji nosicieli oraz ryb zakażonych podklinicznie (63). Dzięki odpowiedniemu przygotowaniu próbki istnieje również możliwość wykorzystania techniki RT-PCR do wykrycia ISAV w wodzie, co może być wykorzystane do oceny ryzyka wystąpienia oraz kontroli ISA (38).

Pierwsza izolacja ISAV w hodowli komórkowej miała miejsce dopiero w 1995 r. w nowo uzyskanej linii z makrofagów nerki głowowej łososia atlantyckiego SHK-1 (salmon head kidney; 8, 64). Efekt cytopatyczny (CPE – cytopathic effect) w SHK-1 pojawia się w zależności od szczepu 10–14 dni po zakażeniu w zerowym pasażu (cząsteczki wirusa w mikroskopie elektronowym są widoczne 2–4 dni po zakażeniu hodowli) i charakteryzuje się zaokrągleniem komórek, a następnie ich odklejeniem od podłoża. W kolejnych pasażach CPE obserwowany jest coraz wcześniej, gdy po czwartym widoczny jest już po 3–4 dniach (8). Wszystkie wyizolowane do tej pory szczepy ISAV namnażają się również w hodowli TO (leukocyty z nerki głowowej łososia atlantyckiego), osiągając w niej wysokie miano (65). CPE pojawia się 4 dnia po zakażeniu i wygląda podobnie jak w hodowli SHK-1 (19). W przypadku linii CHSE-214 (linia nabłonkowa embrionów łososia czawyczy) niektóre szczepy ISAV replikują się w niej, powodując efekt cytopatyczny, inne zaś nie wywołują CPE (19, 66, 67). Wirus namnaża się w linii ciągłej AS (Atlantic salmon) oraz Rtgill-W1 (Rainbow trout gill) pochodzącej ze skrzeli pstrąga tęczowego. W wyniku zakażenia tych komórek nie dochodzi jednak do powstania CPE, a obecność wirusa stwierdzić można jedynie za pomocą odczynu hemadsorpcji, immunofluorescencji, RT-PCR lub mikroskopu elektronowego (10, 67). Optymalna temperatura dla replikacji wirusa wynosi 10–15°C, gdy w temperaturze 25°C wirus nie namnaża się wcale, a w 20°C produkcja cząstek zakaźnych ulega redukcji o 99% (10). W większości wymienionych liniach komórkowych CPE może się pojawiać w wyniku zakażenia innym niż ISAV wirusem, w związku z tym diagnostyka przeprowadzana przy użyciu tej metody musi być zawsze uzupełniona wykonaniem odczynu immunofluorescencji lub RT-PCR.

Technika immunofluorescencji pośredniej z udziałem przeciwciał monoklonalnych 3H6F8 dla białka HE ISAV jest szczególnie czuła w początkowych etapach zakażenia (68, 69). W przypadku wykonywania przy użyciu tej metody diagnostyki zakażeń ISAV w skrawkach mrożeniowych, antygeny wirusa można wykryć we wszystkich badanych narządach (serce, nerka, wątroba, śledziona), jednakże w przypadku preparatów odciskowych odczyn ten powinno wykonywać się jedynie przy użyciu śledziona (68, 70). W zakażonej wirusem hodowli komórkowej świecenie pojawia się 4 godziny po zakażeniu i zlokalizowane jest dookoła jądra, zaś w 24 godziny po zakażeniu widoczne jest przede wszystkim w jądrze (10). Jak do tej pory nie opracowano testu serologicznego wykrywającego poziom przeciwciał u ryb, który zostałby zaakceptowany jako oficjalna metoda wykorzystywana w rutynowych testach diagnostycznych. Wynika to ze specyfiki odpowiedzi humoralnej tej gromady zwierząt, u których dominują przeciwciała klasy IgM o relatywnie niskiej swoistości. W związku z tym, opracowany przez Kibenge i wsp. test ELISA, wykrywający pojawiające się w 6 tygodni po zakażeniu ISAV przeciwciała, po odpowiedniej standaryzacji może w przyszłości znaleźć zastosowanie do wykrywania zakażeń u ryb będących bezobjawowymi nosicielami, a także do oceny poziomu odpowiedzi immunologicznej stymulowanej szczepieniami (55).

## Zwalczanie i zapobieganie

Występowanie zakażnej anemii łososi może zostać znacznie ograniczone przez wprowadzenie regulacji obrotu rybami, ich transportu i przetwórstwa, obowiązkową kontrolę stanu zdrowia ryb, dochodzenie epizootyczne, przestrzeganie zasady „all in/all out”, a także wprowadzenie restrykcji w stosunku do gospodarstw zakażonych, podejrzanych o zakażenie czy z nimi sąsiadujących (60). W Norwegii położono nacisk na tworzenie obszarów wolnych od ISA, wprowadzono ograniczenia dotyczące transportu ryb i sprzętu rybackiego z zakażonych terenów do uznanych za wolne od choroby, obowiązkowe świadectwa zdrowia dla ryb na każdym etapie rozwoju, zakaz użytku wody słonej w wylęgarniach, a także regulacje dotyczące miejsc uboju ryb. Wprowadzone działania ograniczyły występowanie nowych przypadków ISA, ale choroba pojawia się endemicznie. W krajach unijnych, w momencie potwierdzenia zaistnienia ISA, wszystkie ryby chore, martwe, ikra i gamety mają być zniszczone pod nadzorem urzędowym, zaś ryby nie wykazujące objawów klinicznych powinny być usunięte zgod-

nie ze schematem opracowanym przez odpowiednie służby i zatwierdzonym przez Komisję lub przeznaczone do konsumpcji (71, 72). W niektórych przypadkach możliwe jest nadzorowanie dorastania ryb do rozmiarów konsumpcyjnych. Wprowadzenie nowej populacji może się odbyć jedynie pod nadzorem urzędowym po wykonaniu gruntownej dezynfekcji, nie wcześniej niż 6 miesięcy po usunięciu ostatnich ryb (71, 73). Gospodarstwa, które leżą w tej samej strefie przybrzeżnej lub pobierają wodę z tego samego ujęcia wody podlegają również badaniom laboratoryjnym. Konieczne jest także przeprowadzenie dochodzenia epizootycznego (71). Wprowadzenie odpowiednich działań w Szkocji doprowadziło do całkowitego wyeliminowania ISA (ale nie ISAV) w tym kraju, gdzie od 1999 r. nie notowano żadnych nowych przypadków wystąpienia choroby. Nie można jednak wykluczyć sytuacji, w której właściciele gospodarstw nie decydują się na badanie ryb w przypadku występowania jedynie umiarkowanej ich śmiertelności.

Zarówno w Kanadzie, jak i w USA dopuszczone zostało używanie zabitych autoszczepionek w obrębie zakażonej farmy lub farm blisko z nią sąsiadujących. W 2001 r. firma Aqua Health Ltd. – CAN wprowadziła na rynek kanadyjski złożoną szczepionkę Forte V1 zawierającą m.in. inaktywowany ISAV. Badania laboratoryjne wykazały, że szczepionka ta indukuje wysoki poziom odporności na zakażenie ISAV, niewiele jednak wiadomo na temat jej skuteczności w terenie. W Unii Europejskiej istnieje możliwość szczepienia w kierunku ISA, w rejonach występowania choroby i w strefie buforowej otaczającej obszar zakażony (72). Trudno jednak odpowiedzieć na pytanie, czym wykonywać ewentualne szczepienia, gdyż jak do tej pory nie zarejestrowano w Europie żadnej szczepionki anty-ISAV.

## Podsumowanie

Pomimo że pierwszy przypadek ISA został odnotowany w 1984 r., izolacja rybiego ortomyksowirusa będącego czynnikiem etiologicznym choroby miała miejsce dopiero 10 lat później. Kolejne 10 lat intensywnych badań nad ISA znacznie pogłębiły wiedzę na temat występowania i przebiegu choroby, a także samego ISAV. Wiele zagadnień, takich jak budowa nukleokapsydu wirusa, dokładna rola dwóch powierzchniowych glikoprotein w patogenezie choroby, poprzez geograficzne pochodzenie ISAV, współzależność pomiędzy zmiennością genetyczną poszczególnych szczepów a przebiegiem choroby, przebieg odpowiedzi immunologicznej w za-

każeniu oraz udział wolno żyjących ryb łososiowatych w rozprzestrzenianiu choroby, wciąż wymaga jednak wyjaśnienia.

## Piśmiennictwo

1. Council Directive 91/67/EEC of 28 January 1991, concerning the animal health conditions governing the placing on the market of aquaculture animals and products.
2. OIE Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals, 2003. [http://www.oie.int/esp/normes/fmanual/A\\_00016.htm](http://www.oie.int/esp/normes/fmanual/A_00016.htm)
3. Hastings T., Olivier G., Cusack R., Bricknell L., Nylund A., Binde M., Munro P., Allen C.: Infectious salmon anaemia. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 1999, **19**, 286–288.
4. Ustawa z 11 marca 2004 r. o ochronie zdrowia zwierząt oraz zwalczaniu chorób zakaźnych zwierząt (Dz. U. z 2004 r. nr 69, poz. 625).
5. Eliassen T.M., Froystad M.K., Dannevig B.H., Jankowska M., Brech A., Falk K., Romoren K., Gjoen T.: Initial events in infectious salmon anaemia virus infection: evidence for the requirement of a low-pH step. *J. Virol.* 2000, **74**, 218–227.
6. Moneke E.E., Kibenge M.J., Groman D., Johnson G.R., Ikede B.O., Kibenge F.S.: Infectious salmon anaemia virus RNA in fish cell cultures and tissue sections of Atlantic salmon experimentally infected with infectious salmon anaemia virus. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2003, **15** (5), 407–417.
7. Sandvik T., Rimstad E., Mjaaland S.: The viral RNA 3'- and 5'-end structure and mRNA transcription of infectious salmon anaemia virus resemble those of influenza virus. *Arch. Virol.* 2000, **145**, 1659–1669.
8. Dannevig B.H., Falk K., Namork E.: Isolation of the causal virus of infectious salmon anaemia (ISA) in a long-term cell line from Atlantic salmon head kidney. *J. Gen. Virol.* 1995, **76**, 1353–1359.
9. Koren C.W.R., Nylund A.: Morphology and morphogenesis of infectious salmon anaemia virus replicating in the endothelium of Atlantic salmon *Salmo salar*. *Dis. Aquat. Org.* 1997, **29**, 99–109.
10. Falk K., Namork E., Rimstad E., Mjaaland S., Dannevig B.H.: Characterization of infectious salmon anaemia virus, an orthomyxo-like virus isolated from Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) *J. Virol.* 1997, **71**, 9016–9023.
11. Mjaaland S., Rimstad E., Falk K., Dannevig B.H.: Genomic characterization of the virus causing infectious salmon anaemia in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.): an orthomyxo-like virus in a teleost *J. Virol.* 1997, **71**, 7681–7686.
12. Snow M., Ritchie R., Arnaud O., Villoingo S., Aspehaug V., Cunningham C.O.: Isolation and characterisation of segment 1 of the infectious salmon anaemia virus genome. *Virus Res.* 2002, **92**, 99–105.
13. Krossoy B., Hordvik L., Nilsen F., Nylund A., Endresen C.: The putative polymerase sequence of infectious salmon anaemia virus suggests a new genus within the *Orthomyxoviridae*. *J. Virol.* 1999, **73**, 2136–2142.
14. Snow M., Cunningham C.O.: Characterization of the putative nucleoprotein gene of infectious salmon anaemia virus (ISAV). *Virus Res.* 2001, **74**, 111–118.
15. Clouthier S. C., Rector T., Brown N.E.C., Andersen E.D.: Genomic organization of infectious salmon anaemia virus. *J. Gen. Virol.* 2002, **83**, 421–428.
16. Ritchie R. J., Heppell J., Cook M.B., Jones S., Griffiths S.G.: Identification and characterization of segments 3 and 4 of the ISAV genome. *Virus Genes* 2001, **22**, 289–297.
17. Falk K., Aspehaug V., Vlasak R., Endresen C.: Identification and characterization of viral structural proteins of infectious salmon anaemia virus. *J. Virol.* 2004, **78**, 3063–3071.
18. Krossoy B., Devold M., Sanders L., Knappskog P.M., Aspehaug V., Falk K., Nylund A., Koumans S., Endresen C., Bierig E.: Cloning and identification of the infectious salmon anaemia virus haemagglutinin. *J. Gen. Virol.* 2001, **82**, 1757–1765.
19. Kibenge F.S.B., Kibenge M.J.T., McKenna P.K., Stothard P., Marshall R., Cusack R.R., McGeachy S.: Antigenic variation among isolates of infectious salmon

- anaemia virus correlates with genetic variation of the viral haemagglutinin gene. *J. Gen. Virol.* 2001, **82**, 2869–2879.
20. Biering E., Falk K., Hoel E., Thevarajan J., Joerink M., Nylund A., Endresen C., Krossoy B.: Segment 8 encodes a structural protein of infectious salmon anaemia virus (ISAV); the co-linear transcript from Segment 7 probably encodes a non-structural protein. *Dis. Aquat. Org.* 2002, **49**, 117–122.
  21. Ritchie R.J., Bardiot A., Melville K., Griffiths S., Cunningham C.O., Snow M.: Identification and characterization of the genomic segment 7 of the infectious salmon anaemia virus genome. *Virus Res.* 2002, **84**, 161–170.
  22. Kristiansen M., Froystad M.K., Rishovd A.L., Gjoen T.: Characterization of the receptor-destroying enzyme activity from infectious salmon anaemia virus. *J. Gen. Virol.* 2002, **83**, 2693–2697.
  23. Hellebo A., Vilas U., Falk K., Vlasak R.: Infectious salmon anemia virus specifically binds to and hydrolyzes 4-O-acetylated sialic acids. *J. Virol.* 2004, **78**, 3055–3062.
  24. Rimstad E., Mjaaland S., Snow M., Mikalsen A.B., Cunningham C.O.: Characterization of the infectious salmon anemia virus genomic segment that encodes the putative hemagglutinin. *J. Virol.* 2001, **75**, 5352–5356.
  25. Mjaaland S., Hungnes O., Teig A., Dannevig B.H., Thorud K., Rimstad E.: Polymorphism in the infectious salmon anaemia virus hemagglutinin gene: importance and possible implications for evolution and ecology of infectious salmon anaemia disease. *Virology* 2002, **304**, 379–391.
  26. Nylund A., Devold M., Plarre H., Isdal E., Aarseth M.: Emergence and maintenance of infectious salmon anaemia virus (ISAV) in Europe: a new hypothesis. *Dis. Aquat. Org.* 2003, **56**, 11–24.
  27. Griffiths S., Cook M., Mallory B., Ritchie R.: Characterization of ISAV proteins from cell culture. *Dis. Aquat. Org.* 2001, **45**, 19–24.
  28. Krossoy B., Nilsen F., Falk K., Endresen C., Nylund A.: Phylogenetic analysis of infectious salmon anaemia virus isolates from Norway, Canada and Scotland. *Dis. Aquat. Org.* 2001, **44**, 1–6.
  29. Kibenge F.S.B., Garate O.N., Johnson G., Arriagada R., Kibenge M.J.T., Wadowska D.: Isolation and identification of infectious salmon anaemia virus (ISAV) from Coho salmon in Chile. *Dis. Aquat. Org.* 2001, **45**, 9–18.
  30. Ritchie J.R., Cook M., Melville K., Simard N., Cusack R., Griffiths S.: Identification of infectious salmon anaemia virus in Atlantic salmon from Nova Scotia (Canada): evidence for functional strain differences. *Dis. Aquat. Org.* 2001, **44**, 171–178.
  31. Dannevig B.H., Thorud K.E.: Anaemia, pancreas disease and viral erythrocytic necrosis. *Fish Diseases and Disorders, Volume 3: Viral, Bacterial and Fungal Infections, CAB INTERNATIONAL* 1999, 149–175.
  32. O'Halloran J.-L.F., L'Aventure J.P., Groman D.B., Reid A.M.: Infectious salmon anemia in Atlantic salmon. *Can. Vet. J.* 1999, **40**, 351–352.
  33. Rodger H.D., Richards R.H.: Haemorrhagic smolt syndrome: a severe anaemic condition in farmed salmon in Scotland. *Vet. Rec.* 1998, **142**, 538–541.
  34. Bouchard D.A., Brockway K., Giray C., Keleher W., Merrill P.L.: First report of infectious salmon anemia (ISA) in the United States. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 2001, **21**, 86–88.
  35. Rolland J.B., Winton J.R.: Relative resistance of Pacific salmon to infectious salmon anaemia virus. *J. Fish. Dis.* 2003, **26**, 511–520.
  36. Raynard R.S., Snow M., Bruno D.W.: Experimental infection models and susceptibility of Atlantic salmon *Salmo salar* to a Scottish isolate of infectious salmon anaemia virus. *Dis. Aquat. Org.* 2001, **47**, 169–174.
  37. Jarp J., Karlsen E.: Infectious salmon anaemia (ISA) risk factors in sea-cultured Atlantic salmon *Salmo salar*. *Dis. Aquat. Org.* 1997, **28**, 79–86.
  38. Lovdal T., Enger O.: Detection of infectious salmon anaemia virus in sea water by nested RT-PCR. *Dis. Aquat. Org.* 2002, **49**, 123–128.
  39. Nylund A., Hovland T., Hodneland K., Nilsen F., Lovik P.: Mechanisms for transmission of infectious salmon anaemia (ISA). *Dis. Aquat. Org.* 1994, **19**, 95–100.
  40. Raynard R.S., Murray A.G., Gregory A.: Infectious salmon anaemia virus in wild fish from Scotland. *Dis. Aquat. Org.* 2001, **46**, 93–100.
  41. Melville K.J., Griffiths S.G.: Absence of vertical transmission of infectious salmon anaemia virus (ISA) from individually infected Atlantic salmon *Salmo salar*. *Dis. Aquat. Org.* 1999, **38**, 231–234.
  42. Rimstad E., Falk K., Mikalsen A.B., Teig A.: Time course tissue distribution of infectious salmon anaemia virus in experimentally infected Atlantic salmon *Salmo salar*. *Dis. Aquat. Org.* 1999, **36**, 107–112.
  43. Dannevig B.H., Falk K., Skjerve E.: Infectivity of internal tissues of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., experimentally infected with the etiological agent of infectious salmon anaemia (ISA). *J. Fish Dis.* 1994, **17**, 613–622.
  44. Hovland T., Nylund A., Watanabe K., Endresen C.: Observation of infectious salmon anaemia virus in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *J. Fish Dis.* 1994, **17**, 291–296.
  45. Totland G.K., Hjeltens B.K., Flood P.R.: Transmission of infectious salmon anaemia (ISA) through natural secretions and excretions from infected smolts of Atlantic salmon *Salmo salar* during their presymptomatic phase. *Dis. Aquat. Org.* 1996, **26**, 25–31.
  46. Devold M., Krossoy B., Aspenhaug V., Nylund A.: Use of RT-PCR for diagnosis of infectious salmon anaemia virus (ISAV) in carrier sea trout *Salmo trutta* after experimental infection. *Dis. Aquat. Org.* 2000, **40**, 9–18.
  47. Nylund A., Jakobsen P.: Sea trout as a carrier of infectious salmon anaemia virus. *J. Fish Dis.* 1995, **47**, 174–176.
  48. Rolland J.B., Nylund A.: Sea running brown trout: carrier and transmitter of the infectious salmon anaemia virus (ISAV). *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 1998, **18**, 50–55.
  49. Nylund A., Kvenseseth A.M., Krossoy B., Hodneland K.: Replication of the infectious salmon anaemia virus (ISAV) in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J. Fish Dis.* 1997, **20**, 275–279.
  50. Evensen Ø, Thorund K.E., Olsen Y.A.: A morphological study of the gross and light microscopic lesion of infectious anaemia in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Res. Vet. Sci.* 1991, **51**, 215–222.
  51. Speilberg L., Evensen Ø, Dannevig B.H.: A sequential study of the light and electron microscopic liver lesions of infectious anemia in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Vet. Pathol.* 1995, **32**, 466–478.
  52. Falk K., Press C.McL., Landsverk T., Dannevig B.H.: Spleen and kidney of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) show histochemical changes early in the course of experimentally induced infectious salmon anaemia (ISA). *Vet. Immun. Immunopathol.* 1995, **49**, 115–126.
  53. Mikalsen A.B., Teig A., Helleman A.-L., Mjaaland S., Rimstad E.: Detection of infectious salmon anaemia virus (ISAV) by RT-PCR after cohabitant exposure in Atlantic salmon *Salmo salar*. *Dis. Aquat. Org.* 2001, **47**, 175–181.
  54. Kibenge F.S.B., Whyte S.K., Hammell K.L., Rainnie D., Kibenge M.T., Martin C.K.: A dual infection of infectious salmon anaemia (ISA) virus and a togavirus-like virus in ISA of Atlantic salmon *Salmo salar* in New Brunswick, Canada. *Dis. Aquat. Org.* 2000, **42**, 11–15.
  55. Kibenge M.T., Opazo B., Rojas A.H., Kibenge F.S.B.: Serological evidence of infectious salmon anaemia virus (ISAV) infection in farmed fishes, using an indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Dis. Aquat. Org.* 2002, **51**, 1–11.
  56. Falk K., Dannevig B.H.: Demonstration of a protective immune response in infectious salmon anaemia (ISA)-infected Atlantic salmon *Salmo salar*. *Dis. Aquat. Org.* 1995, **21**, 1–5.
  57. Nylund A., Alexandersen S., Lovik P., Jakobsen P.: The response of brown trout (*Salmo trutta* L.) to repeat challenge with infectious salmon anaemia (ISA). *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 1994, **14**, 167–170.
  58. Joseph T., Kibenge M.T., Kibenge F.S.B.: Antibody-mediated growth of infectious salmon anaemia virus in macrophage-like fish cell lines. *J. Gen. Virol.* 2003, **84**, 1701–1710.
  59. Johansen L.-H., Sommer A.-I.: Infectious pancreatic necrosis virus infection in Atlantic salmon *Salmo salar* post-smolts affects the outcome of secondary infections with infectious Salmon anaemia virus or *Vibrio salmonicida*. *Dis. Aquat. Org.* 2001, **47**, 109–117.
  60. OIE Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals, 2003. [http://www.oie.int/esp/normes/fmanual/A\\_00026.htm](http://www.oie.int/esp/normes/fmanual/A_00026.htm)
  61. Optiz H.M., Bouchard D., Anderson E., Blake S., Nicholson B., Keleher W.: A comparison of methods for the detection of experimentally induced subclinical infectious salmon anaemia in Atlantic salmon. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 2000, **20**, 12–22.
  62. Cunningham C.O., Snow M.: Genetic analysis of infectious salmon anaemia virus (ISAV) from Scotland. *Dis. Aquat. Org.* 2000, **41**, 1–8.
  63. Munir K., Kibenge F.S.: Detection of infectious salmon anaemia virus by real-time RT-PCR. *J. Virol Methods* 2004, **117**, 37–47.
  64. Dannevig B.H., Falk K., Press C.McL.: Propagation of infectious salmon anaemia (ISA) virus in cell culture. *Vet. Res.* 1995, **26**, 438–442.
  65. Wergeland H.I., Jakobsen R.A.: A salmonid cell line (TO) for production of infectious salmon anaemia virus (ISAV). *Dis. Aquat. Org.* 2001, **44**, 183–190.
  66. Kibenge F.S.B., Lyaku J.R., Rainnie D., Hammell K.L.: Growth of infectious salmon anaemia virus in CHSE-214 cells and evidence for phenotypic differences between virus strains. *J. Gen. Virol.* 2000, **81**, 143–150.
  67. Sommer A.-L., Mennen S.: Multiplication and haemadsorbing activity of infectious salmon anaemia virus in the established Atlantic salmon cell line. *J. Gen. Virol.* 1997, **78**, 1891–1895.
  68. Snow M., Raynard R.S., Murray A.G., Bruno D.W., King J.A., Grant R., Bricknell I.R., Bain N., Gregory A.: An evaluation of current diagnostic tests for the detection of infectious salmon anaemia virus (ISAV) following experimental water-borne infection of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *J. Fish Dis.* 2003, **26**, 135–145.
  69. Falk K., Namork E., Dannevig B.H.: Characterization and applications of a monoclonal antibody against infectious salmon anaemia virus. *Dis. Aquat. Org.* 1998, **34**, 77–85.
  70. Falk K., Dannevig B.H.: Demonstration of infectious salmon anaemia (ISA) viral antigens in cell cultures and tissue sections. *Vet. Res.* 1995, **26**, 499–504.
  71. Council Directive 93/53/EEC of 24 June 1993, introducing minimum Community measures for the control of certain fish diseases.
  72. Council Directive 2000/27/EC of 2 May 2000, amending Directive 93/53/EEC introducing minimum Community measures for the control of certain fish diseases.
  73. Commission Decision of 13 June 2003, establishing criteria for zoning and official surveillance following suspicion or confirmation of the presence of infectious salmon anaemia (ISA).

Dr A. Ruszczyk, Zakład Wirusologii, Mykologii i Immunologii, Katedry Nauk Przedklinicznych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej SGGW, ul. Ciszewskiego 8, 02-787 Warszawa, E-mail: ruszczyk@alpha.sggw.waw.pl