

**Indagini relative alla sensibilità della metodologia
diagnostica prevista dalla decisione 2001/183/CE,
con particolare riferimento all'allestimento
di campioni collettivi: risultati preliminari**

*Sensitivity of diagnostic method according to directive
2001/183/EC, with particular reference to preparation
of collective samples: preliminary results*

**Lucia Selli¹, Giovanni Toller², Mario Lorenzi²,
Amedeo Manfrin¹, Elisabetta Cappelozza¹, Daniela Ferro¹,
Rosita Quartesan¹, Giuseppe Bovo^{1*}**

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie – Legnaro - PADOVA

² Azienda Provinciale per i Servizi Veterinari di Trento - Tione - TRENTO

RIASSUNTO – Il riconoscimento di aziende e zone indenni da Setticemia Emorragica Virale e Necrosi Ematopoietica Infettiva si fonda su programmi di controllo pluriennali basati sull'assenza di sintomatologia clinica e negatività dei controlli virologici previsti. Le aziende, in possesso dei requisiti strutturali minimi e con due anni di assenza di segni clinici, vengono sottoposte a due campionamenti annuali di 150 soggetti cadauno per due anni consecutivi. Le aziende che risultano negative possono conseguire lo *status* di azienda riconosciuta, ai sensi del DPR 555/92. Ciascun campione di 150 soggetti viene suddiviso in 15 campioni di 10 soggetti cadauno e da essi viene eseguito un pool di organi, unendo frammenti di rene, milza, cervello e cuore da ciascuno dei 10 soggetti. I campioni così preparati vengono omogenati, trattati con antibiotici e con siero anti NPIv (virus della Necrosi Pancreatica Infettiva), inoculati su colture cellulari e controllati regolarmente per rivelare od escludere la comparsa di effetto citopatico, indice di presenza virale. Negli ultimi tempi è sorto il sospetto che, in situazioni di episodi cronici, soprattutto in popolazioni sub-adulte o adulte, l'allestimento di campioni collettivi, così come previsto dalla decisione 2001/183/CE, possa presentare limiti significativi ai fini dell'isolamento dell'agente eziologico. Infatti la presenza contemporanea, nella stessa popolazione, di soggetti positivi per anticorpi specifici ed altri positivi al virus, oppure la presenza di pochi soggetti positivi al virus a basso titolo, potrebbe mascherare il risultato delle indagini virologiche eseguite in forma di campioni collettivi, nel primo caso per neutralizzazione *in vitro* del virus presente e, nel secondo caso, per eccessiva diluizione virale. Al fine di verificare tali possibilità si è ritenuto opportuno condurre un'indagine sottoponendo all'esame virologico, sia i singoli campioni che i rispettivi campioni collettivi, seguendo la metodologia prevista dalla decisione 2001/183/CE. Per questo motivo, sono stati raccolti 60 soggetti, presso un impianto in cui recentemente era stato isolato il virus della NEI in assenza di segni clinici. Da ogni soggetto è stato allestito un campione a partire da rene, milza, cuore e cervello; i 60 pool di organi dei singoli soggetti sono stati analizzati virologicamente su cellule BF-2 ed EPC. Da ogni soggetto è stato inoltre prelevato un campione di siero su cui è stata eseguita la ricerca del titolo anticorpale mediante test di sieroneutralizzazione. Contemporaneamente sono stati allestiti 6 campioni collettivi unendo i pool degli organi dei soggetti 1-10, 11-20, 21-30, 31-40, 41-50 e 51-60 che sono stati analogamente analizzati su cellule BF-2 ed EPC. Nel corso delle indagini è stato possibile isolare il virus della NEI dai pool di organi dei soggetti n. 38 e n. 41, mentre nessuna positività è stata osservata nei sei campioni collettivi. Per quanto concerne l'esame sierologico è stata evidenziata attività neutralizzante significativa (titolo = 1:320) in un unico soggetto. Questi risultati, se pur preliminari, evidenziano la possibilità reale che, nelle indagini routinarie, eseguite secondo la metodologia prevista dalla decisione 2001/183/CE, si possa verificare una mancata identificazione di campioni positivi per il virus della NEI. Per questo motivo si ritiene di particolare interesse continuare le indagini e, se possibile, identificare le possibili cause.

SUMMARY - Approval of farms and areas free from Viral Haemorrhagic Septicemia (VHS) and Infectious Haematopoietic Necrosis (IHN) follows four or six-year control programs, and requires the absence of clinical symptoms and negative virological results. Farms with the minimum structural requirements and a record of two

years without clinical signs of the above diseases, are subjected to two annual samplings of 150 subjects each, for two consecutive years. Farms which are negative may attain the status of approved farms, according to Italian DPR 555/92. Each batch of 150 subjects is subdivided into 15 samples of 10 subjects each, and an organ pool is created, combining specimens of kidney, spleen, brain and heart from each of the 10 subjects. These samples are then homogenized, treated with antibiotics and anti-IPNV (Infective Pancreatic Necrosis virus), inoculated on cell cultures, and checked regularly to reveal or exclude the appearance of cytopathic effects, showing the presence of the virus. Recently, suspicion has arisen that, in situations of chronic outbreaks of disease, above all in sub-adult or adult populations, the preparation of collective samples according to Directive 183/2001/EC may present significant limitations as regards isolation of pathogens. The contemporary presence in the same population of subjects positive for specific antibodies and others positive for the viruses, or the presence of a few subjects positive to low-titer viruses, may mask the result of virological examinations of collective samples due, in the former case, to in vitro neutralization of the virus and, in the latter, to excessive viral dilution. In order to verify this possibility, we conducted virological examinations on both single samples and on the respective collective samples, following the method quoted in Directive 183/2001/CE. Sixty subjects were taken from a farm in which the IHNV virus had recently been isolated, in the absence of clinical signs. Each subject yielded one sample, composed of kidney, spleen, heart and brain; the 60 organ pools of the single subjects were analyzed virologically on BF-2 and EPC cells. A sample of serum was also taken from each subject, and used to search for the antibody titer by means of a serum neutralization test. At the same time, six collective samples were prepared by combining the organ pools of subjects 1-10, 11-20, 21-30, 31-40, 41-50 and 51-60, which were analyzed in a similar way on BF-2 and EPC cells. The IHNV virus was isolated from the organ pools of subjects 38 and 41; the six collective samples were not positive. As regards serological analysis, significant neutralizing activity was shown (titer = 1:320) in only one subject. These results, although preliminary, highlight the real possibility that, during routine examinations carried out following the method of Directive 2001/183/CE, some samples positive for the IHNV virus may not be detected. For this reason, we believe it is of particular interest to continue studies and, if possible, to identify possible causes.

Key words: Directive 2001/183/EC, VHSV, IHNV

* Corresponding Author: c/o Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Viale dell'Università, 10 – 35020 Legnaro (PD) – Italy. Tel. 049-8084248; Fax 049-8084392; E-mail: gbovo@izsvenezie.it

INTRODUZIONE

Secondo il manuale diagnostico O.I.E. (2003) delle malattie degli organismi acquatici e la decisione 2001/183/CE che rappresenta il riferimento ufficiale per il campionamento e le indagini di laboratorio da effettuarsi per ottenere il riconoscimento delle aziende/zone ai sensi del DPR 555/92, i protocolli diagnostici di SEV e NEI prevedono l'isolamento dei rispettivi agenti eziologici ed il loro successivo riconoscimento sierologico o, in alternativa, l'isolamento ed il contemporaneo riconoscimento dell'agente eziologico. Si tratta comunque di metodiche di diagnosi diretta, entrambe caratterizzate dall'evidenziazione dell'agente causale.

Negli ultimi anni, nel corso del piano di sorveglianza in atto nella provincia di Trento, si sono verificati alcuni focolai di NEI, in assenza di sintomatologia e mortalità significative. Le indagini epidemiologiche relative a tali episodi hanno ipotizzato la possibilità che, in talune situazioni, si possano ottenere risultati di laboratorio completamente negativi, a fronte della presenza in impianto di uno stato di infezione di tipo sub-clinico.

Per cercare di chiarire e verificare tale ipotesi si è ritenuto di dover approfondire alcuni aspetti critici della metodica quali, ad esempio, la sensibilità analitica delle colture cellulari, relativamente ai campioni collettivi. Questi campioni, previsti peraltro dalla decisione 2001/183/CE, sono costituiti da pool di rene, milza, cuore, cervello ottenuti da 10 diversi soggetti. Ovviamente la diluizione di ogni campione singolo, effettuata nella costituzione del

pool collettivo, comporta il rischio che la stessa diluizione risulti critica per campioni con basso titolo di positività. Tale evenienza normalmente non dovrebbe rappresentare un rischio reale, in quanto, in caso di infezione, nella popolazione sono presenti anche soggetti caratterizzati da infezione recente in cui il titolo virale è sufficientemente elevato per poter essere evidenziato mediante isolamento su colture.

E' noto inoltre che, in una popolazione esposta al virus, accanto a soggetti infetti e positivi al virus, ve ne siano altri che hanno superato l'infezione acquisendo una positività sierologica. Infatti, a partire dal 1991, sono stati pubblicati alcuni articoli riguardanti la presenza di attività neutralizzante nei confronti del virus della NEI e della SEV, in sieri di trota infettate sperimentalmente o post malattia naturale (Jorgensen *et al.*, 1991; Hattenberger *et al.*, 1989; Hattenberger *et al.*, 1995; Olesen & Jorgensen, 1986; Olesen *et al.*, 1991; 1993).

In questa situazione, l'allestimento di campioni collettivi, in cui possono confluire contemporaneamente il virus dei campioni positivi e gli anticorpi dei campioni sierologicamente positivi, si potrebbe ipotizzare una parziale o totale neutralizzazione del virus presente con conseguente risultato negativo del campione collettivo.

Per verificare questa ipotesi si è deciso, individuata una popolazione con malattia cronica, di saggiare, virologicamente e sierologicamente, un numero significativo di soggetti, confrontando il risultato ottenuto dai singoli soggetti e dai rispettivi campioni collettivi, come descritto dalla decisione 2001/183/CE.

MATERIALI E METODI

Le indagini sono state condotte in un impianto di trota coltura situato in territorio montano in provincia di Trento, caratterizzato da un regime termico regolare con oscillazioni massime, all'origine, di 1° C, per cui nel corso dell'inverno si raggiungono mediamente 8° C e, nel corso dell'estate, 9° C ad inizio impianto ed 11° C in prossimità dello scarico.

In precedenza l'impianto era stato regolarmente sottoposto a controlli clinici da parte del servizio veterinario ufficiale ed i prelievi eseguiti per ottenere il riconoscimento di azienda, secondo la decisione 2001/183/CE, avevano fino ad allora sortito esito negativo. Nel corso di un sopralluogo effettuato in giugno 2003, nell'ambito di una indagine epidemiologica conseguente la comparsa di un focolaio primario in un'azienda collegata, è stata confermata l'assenza di segni clinici riferibili a rhabdovirus dei salmonidi mentre, da un campione prelevato nella stessa occasione, è stato isolato l'agente eziologico della NEI.

Al momento del campionamento nell'impianto erano presenti varie partite appartenenti alle specie trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*) e trota fario (*Salmo trutta*). Nel corso del sopralluogo, si è evidenziata, in una partita di avannotti, la presenza di sintomi clinici riferibili a "sleeping disease", una patologia di probabile origine virale in cui sembra essere coinvolto l'agente eziologico della Pancreas Disease (Boucher & Baudin Laurencin, 1996; Castric *et al.*, 1997; Villoing *et al.*, 2000; McLoughlin *et al.*, 2002).

L'indagine ha riguardato una partita di trote iridee di circa 200 grammi, presente in azienda fin dalla nascita che, al momento del campionamento, non evidenziava alcun segno di malattia e che, a detta del proprietario, non aveva in precedenza evidenziato sintomi riferibili a malattie virali.

I soggetti, subito dopo essere stati catturati venivano sottoposti a prelievo di sangue ed, in attesa del prelievo di organi, posti in sacchetti di polietilene identificati. Da ogni soggetto sono stati prelevati circa 1,5-3 ml di sangue immediatamente trasferiti in provette di plastica mantenute a temperatura ambiente (circa 20° C) per 1 ora e quindi poste, fino al termine del sopralluogo, a 10° C in contenitore refrigerato. Da ogni soggetto sono stati prelevati milza,

cervello, rene e cuore, per la costituzione di campioni singoli e contemporaneamente di campioni collettivi, costituiti da pool di tessuti di 10 soggetti, come indicato nella decisione 2001/183/CE, utilizzando set di forbici e pinze sterili, per ogni soggetto. Complessivamente sono state prelevate 60 trote da cui sono stati allestiti 60 pool di organi ottenuti da singoli soggetti ed ulteriori 6 campioni collettivi costituiti ognuno da pool dei tessuti di 10 soggetti. Subito dopo il prelievo i campioni erano trasferiti in scatole petri di plastica e posti in contenitore refrigerato (10° C) fino al termine del sopralluogo. Tutte le operazioni sono state eseguite seguendo le modalità previste dalla decisione sopra menzionata.

All'arrivo in laboratorio i campioni sono stati trasferiti a 4° C. Il giorno successivo i campioni di sangue sono stati centrifugati a 4.000 RPM per 15 minuti ed il siero inattivato a $42 \pm 1^\circ$ C per 30 min. I sieri raccolti sono stati sottoposti ad indagine sierologia per la ricerca di anticorpi nei confronti del virus della NEI, secondo quanto descritto precedentemente (Olesen & Jorgensen, 1986).

La metodologia seguita per l'allestimento dei campioni e la successiva indagine virologica sono conformi a quanto descritto dalla decisione 2001/183/CE .

I campioni che hanno evidenziato la comparsa di effetto citopatico, sono stati sottoposti ad esame di IF con l'impiego di siero anti-NEI, secondo quanto previsto dalla decisione sopra riportata.

RISULTATI

Come riportato in tabella 1, i risultati ottenuti indicano che su 60 soggetti saggiati singolarmente, due campioni contraddistinti rispettivamente con i numeri 38 e 41 hanno evidenziato comparsa di effetto citopatico. Entrambi i campioni sono stati identificati, tramite IF, quali ceppi virali di NEI. Nessuna positività è stata riscontrata nei campioni collettivi.

L'indagine sierologia condotta sui 60 campioni prelevati, nei confronti del virus della NEI, ha evidenziato la presenza di attività neutralizzante significativa in un unico campione (n. 26) con titolo 1:320.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

I risultati ottenuti dall'esame di 60 campioni di trote prelevate in un impianto recentemente risultato positivo nei confronti del virus della NEI, ma in cui, almeno fino al momento delle indagini, non erano stati rilevati sintomi specifici, hanno rivelato la presenza di positività, nei confronti del virus della NEI, in due campioni esaminati singolarmente, rispettivamente nel campione n. 38 e nel campione n. 41, mentre nessuno dei 6 campioni collettivi ha evidenziato alcuna positività.

Il mancato riscontro di positività nei campioni collettivi n. 4 e 5 costituisce un risultato inatteso che evidenzia il rischio reale di poter considerare come negativo un campione collettivo in realtà positivo. La discrepanza di risultato riscontrata tra l'analisi di campioni singoli e quella di campioni collettivi, potrebbe essere riconducibile ad una diluizione eccessiva del campione singolo tale da superare i limiti di sensibilità del sistema cellulare impiegato o ad altre cause come, ad esempio, la contemporanea presenza, nel campione collettivo, di soggetti positivi virologicamente e di soggetti caratterizzati dalla presenza di anticorpi circolanti nel sangue che potrebbero neutralizzare, nel corso della fase di trattamento antibiotico che viene condotta a 4° C per una notte, la presenza di dosi virali

CAMPIONE	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
ESAME										
Sierologico	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
Viol. singolo	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
Viol. pool 1	Neg									
	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Sierologico	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
Viol. singolo	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
Viol. pool 2	Neg									
	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Sierologico	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	1:320	Neg	Neg	Neg	Neg
Viol. singolo	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
Viol. pool 3	Neg									
	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
Sierologico	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
Viol. singolo	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	POS	Neg	Neg
Viol. pool 4	Neg									
	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
Sierologico	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
Viol. singolo	POS	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
Viol. pool 5	Neg									
	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
Sierologico	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
Viol. singolo	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
Viol. pool 6	Neg									

Tabella 1: Schema riassuntivo dei risultati ottenuti dall'esame sierologico, virologico su singoli soggetti e virologico su campioni collettivi.

Table 1: Virological and serological results performed on single samples and virological results from pooled samples.

TIPOLOGIA DEL CAMPIONE	RISULTATO	
	NEGATIVO	POSITIVO
Virologico su soggetto singolo	58	2 (3,3%)
Virologico su pool di 10 soggetti	6	0
Sierologico	59	1(1:320)

Tabella 2: Risultato delle indagini virologiche e sierologiche

Table 2: Summary of the virological and serological results.

minime, situazione tipica della fase cronica di alcune rhabdovirus dei salmonidi in cui il virus è presente solo nel sistema nervoso centrale e a titoli bassi.

Nel caso osservato, la prima ipotesi sembra essere la più plausibile, in quanto sostenuta dalla tardiva comparsa dell'effetto citopatico in entrambi i campioni, indicativa di una limitata carica virale presente nei tessuti originali ed inoltre, dalla negatività riscontrata negli stessi campioni mantenuti a -80° C, nei quali, successivamente ai primi risultati, si era cercato, senza ottenere peraltro alcun risultato, di calcolare il titolo infettante. Con buona probabilità entrambi i campioni possedevano concentrazioni virali estremamente basse che il congelamento ha ridotto ulteriormente, al di sotto dei limiti di sensibilità della metodica.

Il risultato ottenuto che ovviamente deve essere confermato, estendendo il numero di osservazioni, solleva un quesito circa la sensibilità del metodo analitico previsto dalla normativa comunitaria. Ne deriva una giustificata preoccupazione in quanto, i risultati delle indagini di laboratorio e dei sopralluoghi clinici che, come riportato nel caso osservato, non hanno mai evidenziato la comparsa di sintomatologia evidente, sono alla base del riconoscimento delle aziende. La preoccupazione maggiore deriva innanzitutto dal fatto che i campioni collettivi risultati negativi all'esame virologico, sono stati allestiti secondo le disposizioni contenute nella decisione 2001/183/CE che stabilisce i metodi da seguire per il riconoscimento delle aziende indenni da NEI e SEV.

In attesa di una verifica dei risultati sarebbe opportuno affiancare, alla metodica di isolamento virale, inclusa nella decisione, altre metodiche oggi ritenute più sensibili, quali la reazione a catena della polimerasi (PCR). Un'ulteriore metodica che potrebbe trovare utile applicazione nei piani di sorveglianza è rappresentata dalla sieroneutralizzazione che, in un recente indagine, condotta tra diversi centri di referenza nazionali, ha evidenziato di possedere buona specificità e sensibilità (Olesen, com. personale). Questa metodica potrebbe utilmente essere affiancata alla metodica virologica diretta, durante il corso dell'estate, quando non è possibile effettuare la ricerca del virus, a causa della temperatura eccessivamente elevata che non consente la comparsa della malattia; per contro, nel corso della stagione estiva, l'elevata temperatura dell'acqua consente una più attiva risposta immunitaria, con produzione di anticorpi facilmente rilevabili in laboratorio. La positività sierologica riscontrata, anche se riferita ad un solo soggetto, rappresenta un'indicazione estremamente utile ai fini diagnostici in quanto, in aziende indenni, non si dovrebbero riscontrare valori di sieroneutralizzazione superiori a 1:80 (Olesen & Jorgensen, 1986).

La presenza di un solo campione sierologicamente positivo, suggerisce che l'infezione fosse, con buona probabilità, al momento del prelievo, di origine recente, per cui ne deriva che l'azienda selezionata poco si prestava allo svolgimento delle indagini per soddisfare l'ipotesi iniziale che presupponeva una situazione di malattia cronica.

In conclusione i risultati ottenuti non hanno consentito di confermare o escludere la nostra ipotesi relativamente alla possibilità di una neutralizzazione "*in vitro*" nei campioni collettivi, qualora siano contemporaneamente presenti soggetti positivi al virus e soggetti positivi per anticorpi specifici, in quanto, nei sieri dei campioni collettivi 4 e 5 che contenevano ognuno un campione positivo, non era presente alcun campione con attività neutralizzante. I risultati ottenuti hanno invece evidenziato un preoccupante aspetto per quanto riguarda la sensibilità della metodica diagnostica prevista dalla decisione 2001/183/CE che, nella nostra indagine si è dimostrata insufficiente ad evidenziare la presenza di positività in campioni collettivi, in cui era presente un campione risultato positivo se esaminato singolarmente. Questa osservazione richiede un approfondimento delle indagini per verificare soprattutto se la metodologia applicata sia da ritenersi assolutamente valida o debba essere più vantaggiosamente affiancata da altre metodiche diagnostiche, quali la PCR e la sieroneutralizzazione.

BIBLIOGRAFIA

- Anonimo. Decisione 2001/183/CE del 22 febbraio 2001. *Gazzetta ufficiale delle Comunità Europee del 9.03.2001, L.65/76.*
- Boucher P. & Baudin Laurencin F. (1996). Sleeping disease and Pancreas Disease: comparative histopathology and acquired cross-protection. *J. Fish Dis.*, 19: 303-310.
- Castric, J., Baudin Laurencin F., Bremont M., Jeffroy J., Le Ven A. & Bearzotti M. (1997). Isolation of the virus responsible for sleeping-disease in experimentally infected rainbow-trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, 17: 27-30.
- Hattenberger-Baudouy A.M., Danton M., Merle G. & De Kinkelin P. (1995). Serum neutralization test for epidemiological studies of salmonid rhabdoviroses in France. *Vet. Research*, 26: 512-520.
- Hattenberger-Baudouy A.M., Danton M., Merle G., Torchy C. & De Kinkelin P. (1989). Serological evidence of Infectious Hematopoietic Necrosis in rainbow trout from a french outbreak of disease. *J. Aquatic Animal Health*, 1: 126-134.
- Jorgensen P.E.Vestergaard, Olesen N.J., Lorenzen N., Winton J.R. & Ristow S. (1991). Infectious Hematopoietic Necrosis (IHN) and Viral Hemorrhagic Septicemia (VHS): Detection of Trout Antibodies to the Causative Viruses by Means of Plaque Neutralization, Immunofluorescence, and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Journal of Aquatic Animal Health*, 3: 100-108.
- McLoughlin M.F., Nelson R.N., McCormick J.I., Rowley H.M. & Bryson D.B. (2002). Clinical and histopathological features of naturally occurring pancreas disease in farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *J. Fish Dis.*, 25: 33-43.
- Office International des Epizooties (OIE) (2003). Infectious Haematopoietic Necrosis. In *Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals, 3rd edition*, 2003. OIE. Paris: 86-99.
- Olesen N.J & Jorgensen P.E.Vestergard (1986). Detection of neutralizing antibody to Egtved virus in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) by plaque neutralization test with complement addition. *J. Appl. Ichthyol.*, 2: 33-41.
- Olesen N.J., Lorenzen N. & Jorgensen P.E.Vestergard. (1991). Detection of rainbow trout antibody to Egtved virus by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), immunofluorescence (IF), and plaque neutralization tests (50% PNT). *Dis. Aquat. Org.*, 10: 31-38.
- Olesen N.J., Lorenzen N. & Jorgensen P.E.Vestergard. (1993). Serological differences among isolates of viral haemorrhagic septicaemia virus detected by neutralizing monoclonal and polyclonal antibodies. *Dis. Aquat. Org.*, 16, 163-170.
- Villoing S., Bearzotti M., Chilmonczyk S., Castric J. & Bremont M. (2000). Rainbow Trout Sleeping Disease Is an Atypical Alphavirus. *J. Virol.*, 74, 1: 173-183.