

Rola zakażeń wirusem zakaźnej martwicy trzustki ryb łososiowatych (IPNV) w koinfekcji z innymi wirusami

JOANNA MAJ-PALUCH, MICHAŁ REICHERT

Zakład Chorób Ryb, Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy,
Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Otrzymano 17.03.2017

Zaakceptowano 17.05.2017

Maj-Paluch J., Reichert M.

Role of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) infection in co-infections with other viruses

Summary

Co-infection is an infection of more than one pathogen. In an aquatic environment, the most common occurrence is the appearance of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in the presence of other viruses such as infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV), viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV), infectious salmon anaemia virus (ISAV), or salmonid alphavirus (SAV). In most cases, the IPNV virus reduces the proliferation of other viruses in cell cultures or in the internal organs of salmonids; for example, in IHNV or ISAV co-infections. However, it also happens that there is no significant effect on the multiplication of the virus with which it coexists, e.g. IPNV-VHSV. A body's defense mechanisms, interferon and other interferon-like factors or mutations in the genome play an important role in co-infection.

Keywords: co-infection, infectious pancreatic necrosis virus, cell cultures

Koinfekcja, inaczej określana jako współzakażenie lub infekcja mieszana, to zakażenie więcej niż jednym czynnikiem chorobotwórczym. Taki stan często występuje w środowisku wodnym, w organizmie ryby. Jednym z czynników chorobotwórczych, który często występuje w infekcjach mnogich, jest wirus wywołujący zakaźną martwicę trzustki (IPNV) u ryb łososiowatych, takich jak np.: łosoś, pstrąg, troć czy palia. Jest to wirus należący do rodziny *Birnaviridae*, rodzaju *Aquabirnavirus*. Wirus ten potrafi wywołać śmiertelność u ryb od poniżej 10% do ponad 90% w zależności od szczepu wirusa, ilości, wieku gospodarza czy środowiska (11, 20). Izolowany jest z różnych gatunków ryb zarówno morskich, jak i słodkowodnych, jego obecność odnotowuje się również u małży i wrotek (22, 24). Wirus IPN często występuje razem z wirusami wywołującymi takie choroby, jak wirusowa posocznica krwotoczna ryb łososiowatych (VHS) (24), zakaźna martwica układu krwiotwórczego ryb łososiowatych (IHN) (4, 6, 24), śpiączka ryb łososiowatych (SAV) (1) czy zakaźna anemia łososi (ISA) (13). Może równocześnie wystąpić także z bakteryjną chorobą nerek BKD (29).

Pierwotna infekcja u ryb łososiowatych Aquabirnavirusami, Picornavirusami, Aquareovirusami stymuluje układ immunologiczny i zapobiega infekcji innymi wirusami, takimi jak: VHSV, IHNV (9, 14, 16) czy Nodavirusami (27) zarówno *in vivo*, jak i *in vitro*.

Koinfekcja birnawirus (IPNV)–rabdowirusy (IHNV, VHSV)

Alonso M. i wsp. (2) w 2003 r. przedstawili wpływ wirusa IPN na replikację IHNV i zaobserwowali spadek wirulencji szczepów wirusa IHN. Byrne i wsp. (6) w 2008 r. również badali wpływ wirusa IPN na infekcję IHNV. Sprawdzano obecność wirusa oraz jego koncentrację. Badano aktywność fagocytów w leukocytach z części nerki przedniej za pomocą chemiluminescencji, aktywność dopełniacza w osoczu za pomocą testu hemolitycznego oraz aktywność neutralizującą w osoczu ryb metodą płytkową. Tak jak oczekiwano, nie zaobserwowano śmiertelności w grupie kontrolnej ryb oraz u ryb zakażonych tylko wirusem IPN, natomiast u ryb zakażonych tylko wirusem IHN śmiertelność sięgała 72%. W przypadku ryb poddanych koinfekcji zaobserwowano 2% śmiertelność. Koinfekcja nie miała wpływu na replikację wirusa IPN. Po 28 dniach od zakażenia nie identyfikowano wirusa IPN w badanych próbkach, natomiast w przypadku wirusa IHN obserwowano spadek jego koncentracji od 4. do 28. dnia po zakażeniu u ryb z koinfekcją. Po 63. dniu od zakażenia wirusem IHN nie identyfikowano go w żadnej z badanych grup ryb. Badania Byrne i wsp. nie definiują jednoznacznie roli wirusa zakaźnej martwicy trzustki w ograniczaniu wirusa IHN u ryb z podwójną infekcją.

La Patra i wsp. (17) także opisywali różne poziomy śmiertelności w populacji pstrągów tęczowych, u których naturalnie występowała i została zidentyfikowana

koinfekcja IPN–IHN. Grupa pstrągów tęczowych, u której powszechnie występował IHN, wykazywała dużą śmiertelność, natomiast w grupie ryb z podwójną infekcją śmiertelność była niższa. Ich badania są zgodne z badaniami Alonso i wsp. (2), którzy stwierdzili aktywną rolę wirusa IPN w obniżeniu namnażania wirusa IHN w liniach komórkowych. W większości badań nad koinfekcją mechanizm wywoływania odporności nie jest zrozumiały i różne czynniki są brane pod uwagę, np. produkcja interferonu, inhibicja replikacji wirusa czy stymulacja zarówno specyficznych (limfocyty cytotoksyczne), jak i niespecyficznych (limfocyty NK) komórek odpornościowych. Alonso i wsp. wykorzystali metody biologii molekularnej łańcuchową reakcję polimerazy (PCR), cytometrię przepływową oraz technikę northern-blot do identyfikacji wirusów. Ich badania wykazały, że w pojedynczej infekcji IPNV szybko replikuje i wykazuje wysoki poziom cząstek infekcyjnych na początku zakażenia, natomiast w podwójnej infekcji IPNV jest faworyzowany w porównaniu z IHNV, a jego poziom wzrostu nie jest mniejszy, w porównaniu do pojedynczej infekcji. W następujących po sobie pasażach próbki S46 zawierającej obydwie wirusy zauważono utratę wirusa IHN, co sugeruje, że ingerencja w koinfekcję nie jest zależna od wirusa IHN. Rezultaty otrzymane przez Alonso i wsp. w 1999 r. wskazują, że IPNV odgrywa aktywną rolę w redukcji poziomu wzrostu IHNV oraz interferon nie jest zaangażowany w tę redukcję. Podobnie de Kinkelin i wsp. (14) nie byli w stanie wykryć interferonu jako możliwego sprawcy obniżenia śmiertelności u pstrągów tęczowych.

W 2003 r. Alonso wraz ze współpracownikami (2) ponownie opisywał badania nad podwójnym zakażeniem wirusem zakaźnej martwicy trzustki ryb łososiowatych oraz zakaźnej martwicy układu krwiotwórczego ryb łososiowatych. Postawili oni tezę, że genom wirusa IPN oraz IHN może wykazywać wysoki poziom mutacji. Pojedyncza mutacja punktowa w genomie wirusa może prowadzić do zmiany charakterystyki fenotypowej, np. zmiany w wirulencji i tropizmie. Alonso i wsp. podjęli się sprawdzenia tej tezy. Do identyfikacji obu wirusów u pstrągów tęczowych wykorzystali test neutralizacji z przeciwciałami poliklonalnymi oraz metodę RT-PCR. Równocześnie przeprowadzili badania *in vitro* na linii komórkowej BF-2 (komórki fibroblastyczne narybku basa wielkogębowego, bluegil fry) stwierdzając, że IPNV koliduje z replikacją wirusa IHN. Po kilku pasażach próbki z podwójną infekcją IHN nie był identyfikowany metodą RT-PCR, dlatego wprowadzono metodę nested-PCR do wykrywania niskiego miana IHNV w obecności IPNV. Zauważono, że mniejsza wirulencja wirusa IHN w obecności wirusa IPN, jest skorelowana ze specyficznymi zmianami w genie glikoproteiny. Ponadto stwierdzono metodą cytometrii przepływowej, że leukocyty pozyskane od ryb z podwójną infekcją po 45 dniach po infekcji wykazywały wyższy poziom antygenów wirusa IPN niż IHN. W analizowanym genie glikoproteiny wirusa IHN

stwierdzono 14 substytucji w centralnym regionie genu G w porównaniu do sekwencji szczepu oznaczonego jako IHN.RB (Round Butte) (15). Gdy porównywano gen G wirusa IHN z sekwencji pochodzącej z koinfekcji (IHNV/IPNV.S46) do sekwencji LR.73 wirusa IHN z bazy GeneBank, zauważono dwie różnice w pozycji 67 i 436, które początkowo uznano za istotne, jednakże w innych dziesięciu losowo wybranych sekwencjach z tej bazy również znaleziono te same zmiany, dlatego ostatecznie stwierdzono, że nie mają one znaczenia.

O podwójnych zakażeniach birnawirus–rabdowirus pisano już w latach 70. XX wieku, np. Schlotfeld i wsp. w 1975 r. (28) przedstawili informacje dotyczące pstrąga tęczowego zakażonego zarówno wirusem IPN, jak i VHS. Rodriguez i wsp. (23) kilkakrotnie wracali do badań nad interakcją birnawirus–rabdowirus. W 2005 r. (24) opisał badania, w których użyto serotypu Sp wirusa IPN oraz szczepu VR 714 wirusa IHN, a także szczepu D wirusa VHS. Linię komórkową BF-2 oraz EPC (*epithelioma papulosum cyprini*, komórki epithelialne karpia) zakażano oddzielnie trzema wirusami VHS, IHN, IPN, a także mieszaniną VHS-IPN oraz IHN-IPN. Komórki BF-2 sprawdzano pod kątem zdolności do indukowania czynników przeciwwirusowych, a także zdolności wydzielania interferonu, który stymulowałby nowe warstwy komórek oraz przyczyniałby się do utraty zakaźności wirusa. Miano wirusa IHN w pojedynczej infekcji było wyższe niż w infekcji mieszanej. Natomiast w przypadku wirusa VHS odnotowano podobne miano obu wirusów zarówno w komórkach BF-2, jak i EPC. Badania Rodrigueza i wsp. wykazały, że podwójna infekcja wirusami VHS i IPN nie ma wpływu na replikację któregośkolwiek z tych wirusów w komórkach BF-2 lub EPC, natomiast infekcja komórek BF-2 wirusami IHN i IPN wpływa na zmniejszenie miana rabdowirusa IHN, co znacząco widoczne było w trzecim pasażu. Dodatkowo, metodą RT-PCR wykrywano RNA wirusa VHS i IPN przez trzy następujące po sobie pasażę, natomiast materiał genetyczny wirusa IHN stwierdzano tą metodą tylko w pierwszym pasażu próbki z koinfekcją. Rodriguez i wsp. stwierdzili, że mechanizmy interakcji gospodarz–wirus są jeszcze słabo poznane w przypadku rabdowirusowych infekcji u ryb. Jest za mało informacji dotyczących różnego namnażania się IHNV i VHSV w obecności wirusa IPN. Jednym z wyjaśnień może być teoria, iż wirus IPN szybciej rośnie i replikuje, a tym samym konkuruje z wirusem IHN, dlatego też podczas kolejnych pasaży jest więcej wirusa IPN w porównaniu do IHN. Wirus wirusowej posocznicy krwotocznej ryb łososiowatych (VHSV) replikuje na podobnym poziomie do wirusa IPN, dlatego nie są widoczne różnice.

Brudesth i wsp. w 2002 r. (5) scharakteryzowali interakcje między wirusami IHN i VHS podczas eksperymentalnej koinfekcji u pstrągów tęczowych, a także rozprzestrzenianie wirusa, zmiany histopatologiczne czy replikację wirusa w nerce. Doszli do wniosku, że podwójne zakażenie nie obniża miana wirusów

w znaczący sposób w nerkach pstrągów tęczowych, jakkolwiek rozprzestrzenianie się wirusa IHN w narządach wewnętrznych było bardziej ograniczone i nie zidentyfikowano go w komórkach mózgu, co świadczyłoby o współzawodnictwie o dostęp do tych samych receptorów komórkowych. Te dane są zgodne częściowo z obserwacjami Rodrigueza i wsp. (24) podczas podwójnej infekcji VHSV–IPNV. Wirusy mogą infekować komórki linii komórkowych jednocześnie, uzyskując podobne miana, ale IPNV nie konkuruje z VHSV o miejsca przyłączenia, tak jak zaobserwowano dominację wirusa IPN w porównaniu do wirusa IHN w komórkach linii BF-2 (2). Rodriguez i wsp. wspominają o jeszcze jednym czynniku, który mógłby wpłynąć na wzrost wirusa, a mianowicie produkcji interferonu, przez komórki gospodarza, pod wpływem obecności białek wirusowych. Badania Rodrigueza i wsp. sugerują, że produkcja interferonu *in vitro* jest wysoce zależna od hodowli komórkowej. Jensen i wsp. (12) potwierdzili zdolność komórek CHSE-214 (Chinook salmon embryo) do produkcji interferonu typu I pod wpływem czynników infekcyjnych.

Współistnienie rabdowirusa IHN i birnawirusa IPN opisywali Barlic-Maganja D. i wsp. (4), ale skupili się bardziej na porównaniu metod identyfikacji aniżeli wyjaśnianiu współzależności między wirusami. Oba wirusy wywołują zakażenia z wysoką śmiertelnością u różnych gatunków ryb, zwłaszcza u ryb młodych. Linie komórkowe EPC (*Epithelioma papulosum cyprini*) i BF-2 (bluegill fry) zakażono, odpowiednio, wirusami IHN i IPN. Identyfikację wirusów przeprowadzano metodą IFAT po konwencjonalnej izolacji z linii komórkowych, jednakże ta metoda nie jest odpowiednia do identyfikacji wirusów w stanie latentnym, czyli gdy nie dochodzi do namnażania się cząstek wirusowych, dlatego też wykorzystali w swoich badaniach również metody molekularne. Porównywali czułość obu zastosowanych technik do identyfikacji zarówno wirusa IHN, jak i IPN izolowanych w przypadkach koinfekcji, wykazując większą czułość metody RT-PCR.

Temat superinfekcji wirusem IPN powraca stale wśród naukowców w kolejnych latach. W 2011 r. Garcia i wsp. (8) opisywali, jak komórki wcześniej zainfekowane wirusem IPN chronią przed superinfekcją z wirusami takimi jak IHN czy VHS. Poziom ekspresji genu Mx indukowanego interferonem określano w komórkach zakażonych wirusem IPN i porównywano do standardowych komórek EPC. W rezultacie otrzymano wynik umiarkowanego wpływu ekspresji genu Mx na replikację wirusa IPN. Garcia i wsp. wyjaśnili powód analizy badanych próbek na komórkach EPC. Pierwszy był związany z tym, że nie jest to linia komórkowa pochodząca od ryb łososiowatych. Drugi powód był taki, że podatność komórek EPC do rybich rabdowirusów pozwoliło zbadać wpływ wirusa IPN na inne wirusy. Szczepy wirusa IPN, którymi dysponowano (serotypy Ab i Sp), zabijały komórki linii CHSE-214 (komórki fibroblastyczne łososia czawycza, chinook salmon

embryo) i RTG-2 (komórki gonad pstrąga tęczowego, rainbow trout gonad), w przeciwieństwie do komórek linii EPC (komórki epitelialne karpia, *epithelioma papulosum cyprini*), które przeżywały infekcję wirusem IPN w temperaturze 14°C, wykazując tylko niewielki efekt cytotatyczny i brak śmiertelności. Według Garcia i wsp. komórki EPC mają „przyzwolenie na infekcję IPNV, w zamian za to wirus ich nie zabija”. Tego typu sytuacje zauważono i opisywano już w latach 70. Pisali o tym m.in. Hedric i wsp. w 1978 r. (10). MacDonald i Kennedy w 1979 r. (18), a w 2010 r. Marjara i wsp. (19) czy Rodriguez i wsp. (25).

Koinfekcja birnawirus (IPNV)–orthomyxowirus (ISAV)

Wirus zakaźnej martwicy trzustki ryb łososiowatych koegzystuje nie tylko z rabdowirusami, ale też opisywane są w literaturze przypadki podwójnych infekcji wirusa IPN z wirusem zakaźnej anemii łososi (ISAV) (13). Patogen ten należy do rodziny orthomyxowirusów i podobnie jak IPNV może występować w formie wirulentnej i niewirulentnej, co uzależnione jest od mutacji w obszarze HPR genu hemaglutyniny. Wirulentne szczepy ISAV mają delecję w regionie HPR genu hemaglutyniny i prawdopodobnie wywodzą się z HPR0 ISAV. W swoich badaniach Johansen i Sommer (13) narybek łososia atlantyckiego (*Atlantic salmo salar* L.) zakażali wirusem IPN, a następnie ISAV, potwierdzając, że ryby wcześniej zakażone IPNV wykazywały niższą śmiertelność z powodu zakażenia ISAV aniżeli ryby zakażone tylko wirusem ISA. Dane te tłumaczą produkcją interferonu lub czynników interferonowo podobnych przez ryby, które są indukowane pod wpływem kontaktu z wirusem. Jeśli IFN jest głównym czynnikiem ochrony przeciwko ISAV, te badania popierają obserwacje, że tylko ryby z ostrym zakażeniem zakaźną martwicą trzustki są chronione przed ISAV, jakkolwiek niespecyficzna odpowiedź immunologiczna może być spowodowana innymi czynnikami niż interferon. O tego typu infekcji mieszanej pisano już wcześniej, w 1995 r. Melby i Falk (21) stwierdzili, że zakażenie wirusem IPN tkanek zainfekowanych wcześniej wirusem ISA nie wpływa na zmniejszenie tego zakażenia.

Koinfekcja birnawirus (IPNV)–alfawirus (SAV)

Badania koinfekcji birnawirus–alfawirus nie spotyka się często w literaturze. Tylko nieliczni naukowcy pokusili się o przeprowadzenie badań w tym kierunku, wysnuwając ciekawe wnioski. Wirus śpiączki ryb łososiowatych (SAV) należy do rodzaju *Alphavirus*, rodziny *Togaviridae*. Występuje sześć podtypów, które umownie określane są jako jeden SAV.

Badania nad wirusem IPN oraz SAV prowadzili m.in. Abdullah i wsp. (1). Podeszli oni do tego tematu od innej strony niż czyniono to dotychczas. Sprawdzali odporność łososi atlantyckich na zakażenie wirusem IPN poprzez wcześniejsze szczepienie ryb szczepionką zawierającą konstrukty z białkiem poliproteiny pSAV/PP oraz białkiem VP2 pSAV/pVP2. Zaobserwowano

istnienie od niskiej lub średniej ochrony przeciwko IPNV u ryb immunizowanych szczepionką z replikonem pSAV/PP, natomiast u ryb immunizowanych szczepionką z innym konstruktem (pSAV/pVP2) nie obserwowano ochrony przed wirusem IPN. Shothem Sven Amund (dane niepublikowane) badał wpływ wirusa zakaźnej martwicy trzustki oraz wirusa śpiączki ryb łososiowatych na komórki linii CHSE-214. Stwierdził, że SAV zakłóca replikację wirusa IPN, a nie odwrotnie. SAV indukuje powstawanie interferonu IFN- α oraz Mx w komórkach CHSE-214, w przeciwieństwie do IPNV. Potwierdził, że nie jest do końca pewne, czy inne cytokiny o aktywności przeciwwirusowej nie są również zaangażowane w mechanizmy obronne.

Jak widać z przytoczonych danych piśmiennictwa, wirus zakaźnej martwicy trzustki ryb łososiowatych (IPNV) lubi współistnieć z innymi wirusami i często odnotowuje się przypadki, kiedy ryba jest zakażona dwoma lub więcej czynnikami chorobotwórczymi. Wirus ten, jeśli nie jest patogenny, nie wpływa negatywnie na zdrowotność ryby, a może ją chronić przed zakażeniem innym wirusem, nie doprowadzając do jej śmierci np. przed IHNV. Pomimo iż wielu naukowców już od lat 70. porusza problem koinfekcji z udziałem wirusa IPN, to jednak nie do końca wiadomo, dlaczego tak się dzieje, że IPNV namnaża się w większym stopniu niż IHNV, że nie konkuruje w taki sam sposób z innymi wirusami, jak np. z VHS, czy że jego namnażanie zostaje zakłócone przez SAV. Wyjaśnienia są różne i głównie mówi się o mechanizmach obronnych organizmu pod wpływem czynników chorobotwórczych, o wytwarzaniu interferonu lub innych czynników interferonowo podobnych, ale też niektórzy twierdzą, że to wszystko spowodowane jest mutacjami w danym genie. Warto byłoby się pokusić o przeprowadzenie kolejnych badań i sprawdzenie wszystkich możliwości zakażenia *in vivo* i *in vitro*, a także z różnymi kombinacjami szczepów wirusa oraz przeanalizowanie genomu wirusa IPN. Może wtedy udałoby się potwierdzić lub zaprzeczyć tezę postawioną dotychczas i wyjaśnić mechanizmy koinfekcji.

Piśmiennictwo

1. Abdullah A., Olsen Ch. M., Hodneland K., Rimstad E.: A polyprotein-expressing Salmonid Alphavirus replicon induces Modest protection in Atlantic Salmon (*Salmo Salar*) against infectious pancreatic necrosis. *Viruses* 2015, 7, 252-267.
2. Alonso M., Rodriguez Saint-Jean S., Perez-Prieto S. I.: Virulence of infectious hematopoietic necrosis virus and infectious pancreatic necrosis virus coinfection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and nucleotide sequence analysis of the IHNV glycoprotein gene. *Arch. Virol.* 2003, 148, 1507-1521.
3. Alonso M., Rodriguez S., Pérez-Prieto S. I.: Viral coinfection in salmonids: infectious pancreatic necrosis virus interferes with infectious hematopoietic necrosis virus. *Arch. Virol.* 1999, 144, 657-673.
4. Barlic-Maganja D., Strancar M., Hostnik P., Jencic V., Grom J.: Comparison of the efficiency and sensitivity of virus isolation and molecular methods for routine diagnosis of infectious hematopoietic necrosis virus and infectious pancreatic necrosis virus. *J. Fish Dis.* 2002, 25, 73-80.
5. Brudesth B. E., Castric J., Evensen O.: Studies on pathogenesis following single and double infections with viral hemorrhagic septicemia virus and infectious hematopoietic necrosis virus in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Vet. Pathol.* 2002, 39, 180-189.
6. Byrne N., Castric J., Cabon J., Quentel C.: Study of the viral interference between infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) and infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Shellfish Immunol.* 2008, 24, 489-497.
7. Chinchar V. G., Logue O., Antao A., Chinchar G. D.: Channel catfish reovirus (CRV) inhibits replication of channel catfish herpesvirus (CCV) by two distinct mechanisms: viral interference and induction of an antiviral factor. *Dis. Aquat. Org.* 1998, 33, 77-85.
8. Garcia I., Galiana A., Falcó A., Estepa A., Perez L.: Characterization of an infectious pancreatic necrosis (IPN) virus carrier cell culture with resistance to superinfection with heterologous viruses. *Vet. Microbiol.* 2011, 149, 48-55.
9. Hedrick R. P., La Patra S. E., Yun S., Lauda K. A., Jones G. R., Congleton J. L.: Induction of protection from infectious hematopoietic necrosis virus in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* by pre-exposure to the avirulent cutthroat trout virus (CTV). *Dis. Aquat. Org.* 1994, 20, 111-118.
10. Hedrick R. P., Leong J. C., Fryer J. F. L.: Persistent infection in salmonid fish cells with infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). *J. Fish Dis.* 1978, 1, 297-308.
11. Jarp J., Gjevre A. G., Olsen A. B., Bruheim T.: Risk factor for furunculosis, infectious pancreatic necrosis virus and mortality in post-smolt of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *J. Fish Dis.* 1994, 18, 67-78.
12. Jensen I., Larsen R., Robertsen B.: An antiviral state induced in Chinook salmon embryo cells (CHSE-214) by transfection with the double-stranded RNA poly I:C. *Fish Shellfish Immunol.* 2002, 13, 367-378.
13. 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.
14. Kinkelin P. de, Dorson M., Renault T.: Interferon and viral interference in viruses of salmonids fish. *Proc. OJI Internat. Symp Salmonids Fishes.* Hokkaido University Press, Sapporo 1992, 241-249.
15. Koener J. F., Passavant C. W., Kurath G., Leong J.: Nucleotide sequence of a cDNA clone carrying the glycoprotein gene of infectious hematopoietic necrosis virus, a fish rhabdovirus, and gene order determination by R-loop mapping. *J. Virol.* 1985, 61, 1342-1349.
16. Patra S. E. La, Lauda K. A., Jones G. R.: Aquareovirus interference mediated resistance to infectious hematopoietic necrosis virus. *Vet. Res.* 1995, 26, 455-459.
17. Patra S. E. La, Lauda K. A., Woolley M. J., Armstrong R.: Detection of naturally occurring coinfection of IHNV and IPNV in rainbow trout. *Am. Fish Soc. Fish Health Sect. Newsl.* 1993, 21, 9-10.
18. MacDonald R. D., Kennedy J. C.: Infectious pancreatic necrosis virus persistently infects chinook salmon embryo cells independent of interferon. *Virology* 1979, 95, 260-264.
19. Marjara I. S., Thu B. J., Evensen O.: Differentially expressed genes following persistent infection with infectious pancreatic necrosis virus *in vitro* and *in vivo*. *Fish Shellfish Immunol.* 2010, 28, 845-853.
20. McAllister P. E., Owens W. J.: Assessment of the virulence of fish and molluscan isolates of infectious pancreatic necrosis virus for salmonid fish by challenge of brook trout, *Salvelinus fontinalis* (Mitchill). *J. Fish Dis.* 1995, 18, 97-103.
21. Melby H. P., Falk K.: Study of the interaction between a persistent infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) infection and experimental infectious pancreatic salmon anaemia (ISA) in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *J. Fish Dis.* 1995, 18, 579-586.
22. Reno P. W.: Infectious pancreatic necrosis and associated aquatic birnaviruses. Woo P. T. K., Bruo D. W. (eds): *Fish Diseases and Disorders*. Vol 3. Viral, bacterial and fungal infections. CABI Publishing, New York 1999.
23. Rodriguez S., Alonso M., Perez-Prieto S.: Comparison of two birnavirus-rhabdovirus coinfections in fish cell lines. *Dis. Aquat. Org.* 2005, 67, 183-190.
24. Rodriguez S., Borrego J. J., Pérez Prieto S. I.: Infectious pancreatic necrosis virus: biology, pathogenesis and diagnostic methods. *Adv. Virus Res.* 2003, 62, 113-165.
25. Rodriguez S., de las Heras A. I., Perez-Prieto S. I.: The persistence of infectious pancreatic necrosis virus and its influence on the early immune response. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2010, 136, 81-91.
26. Rolando Pakingking J., Mori K. I., Sugaya T., Oka M., Okinaka Y., Nakai T.: Aquabirnavirus-induced protection of marine fish against piscine nodavirus infection. *Fish Pathol.* 2005, 40, 125-131.
27. Rolando Pakingking J., Takano R., Nishizawa T., Mori K. I., Lida Y., Arimoto M.: Experimental coinfection with aquabirnavirus and viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV), *Edwardsiella tarda* or *Streptococcus iniae* in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fish Pathol.* 2003, 38, 15-21.
28. Schlotfeldt H. J., Frost J. W.: Doppelinfektion von Regenbogenforellen mit dem Virus der viralen hämorrhagischen Septikämie (VHS) und dem Virus der infektiösen Pankreasnekrose (IPN). *Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr.* 1975, 88, 455.
29. Yamamoto T.: Infectious pancreatic necrosis virus and bacterial kidney disease appearing concurrently in populations of *Salmo gairdneri* and *Salvelinus fontinalis*. *J. Fish Res. Board Can.* 1975, 32, 92-95.

Adres autora: mgr inż. Joanna Maj-Paluch, Al. Partyzantów 57, 24-100 Pulawy; e-mail: joanna.maj@piwet.pulawy.pl