

MONOGRAFIE

Viral encephalopathy and retinopathy

Encefalopatia e retinopatia virale

Chiara Maltese, Giuseppe Bovo*

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Viale dell'Università, 10 -
35020 Legnaro (PD), Italy

SUMMARY - Viral encephalopathy and retinopathy is a serious disease causing significant economic damages to marine aquaculture industry. The disease has a wide geographical distribution having been observed in tropical and temperate climates. More than forty species mainly of marine origin have been so far affected and this number is likely to rise in future following the introduction of new species and the increase of aquaculture trade. According to OIE all fish mortalities characterized by abnormal swimming behaviours associated with vacuolar lesions in the nervous tissues containing viral particles of the *Nodaviridae* family should be ascribed to one single disease, officially identified as viral encephalopathy and retinopathy (VER) also known as viral nervous necrosis (VNN). Affected fish may show different clinical symptoms depending on species, age and temperature; furthermore acute and sub-acute forms characterized by slightly different symptoms and mortality rates are also known. The most characteristic and common clinical sign observed among the different species is an abnormal swimming behaviour characterized by fish showing difficulties to maintain the normal static and dynamic equilibrium, speed and swimming direction and to control the swim bladder inflation. The viral aetiology has been confirmed following the identification of small, non enveloped, RNA agents definitively assigned to the *Nodaviridae* family, genus *Betanodavirus*. The existence of four genotypes characterized by high homology has been proposed on the basis of the viral genome analysis. Although horizontal transmission undoubtedly represents the most common transmission route, vertical transmission has also been highly suspected, at least for some species. VER/VNN is commonly diagnosed after isolation of the causative agent in cell cultures followed by identification with immunological or molecular methods. The control of the disease is complicated by difficulties in both applying strict hygiene and preventive measures in open environments like the sea and in selecting broodfish free from infection. Although currently under study, commercial vaccines are unfortunately not yet available.

RIASSUNTO - *L'encefalopatia e retinopatia virale è una grave patologia in grado di causare ingenti danni economici all'acquacoltura marina. La malattia, caratterizzata da lesioni a carico del tessuto nervoso, è stata segnalata in oltre quaranta specie ittiche, prevalentemente marine; inoltre, è probabile che questo numero di ospiti, già particolarmente elevato, possa aumentare ulteriormente in futuro a seguito dell'introduzione di nuove specie e dell'aumento dei movimenti commerciali.*

In accordo all'OIE, i vari episodi di mortalità, verificatisi in aree geografiche e specie diverse, caratterizzati da sintomatologia nervosa ed associati alla presenza di particelle virali appartenenti alla famiglia Nodaviridae, vanno ricondotti ad un'unica malattia, denominata ufficialmente encefalopatia e retinopatia virale, nota anche come necrosi nervosa virale, la quale può essere sostenuta da uno o più agenti virali, molto simili tra loro. I soggetti colpiti dalla malattia possono evidenziare diversa sintomatologia clinica, in funzione della specie, età e temperatura; inoltre, sono note forme acute e subacute, cui possono corrispondere differenze nella sintomatologia e mortalità. Il segno che maggiormente accomuna e caratterizza i vari episodi descritti nelle diverse specie è rappresentato da una evidente anomalia natatoria che si manifesta con difficoltà di mantenimento dell'equilibrio statico e dinamico, controllo della velocità e direzione di nuoto, nonché della capacità di regolare il grado di dilatazione della vescica natatoria. La malattia è caratterizzata da un'ampia diffusione geografica, essendo stata segnalata sia in regioni tropicali che temperate. L'eziologia virale è stata confermata a seguito dell'identificazione di un agente a RNA, privo di envelope, definitivamente assegnato alla famiglia Nodaviridae, genere Betanodavirus. In base a studi del genoma virale è stata proposta l'esistenza di

quattro genotipi, caratterizzati da elevata omologia. La trasmissione orizzontale rappresenta senz'altro l'evento più comune di trasmissione della malattia. Inoltre, almeno per talune specie, è stata ipotizzata anche la possibilità di trasmissione verticale.

La diagnosi può essere eseguita tramite isolamento dell'agente causale su colture cellulari, seguito da identificazione mediante metodi immunologici o biomolecolari. Il controllo della malattia è reso difficile dalla difficoltà di poter applicare in ambienti aperti, come quello marino, rigide misure di igiene e profilassi nonché la difficoltà di approvvigionamento di riproduttori indenni dall'infezione. Purtroppo, anche se in fase di studio, non sono a tutt'oggi disponibili validi vaccini commerciali.

Key words: Viral encephalopathy and retinopathy, VER, Viral nervous necrosis, VNN, Betanodavirus, Marine fish, Central nervous system, Retina, Abnormal swimming behaviour.

* Corresponding author: c/o Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, viale dell'Università, 10 - 35020 Legnaro (PD) – Italy. Phone: 0039 049 8084248, Fax: 0039 049 8084392; E-mail: gbovo@izsvenezie.it.

English version**NAME AND HISTORY**

Viral encephalopathy and retinopathy (VER) (Munday *et al.*, 1992; OIE, 2006), also known by synonyms seabass encephalitis (Bellance & Gallet de Saint-Aurin, 1988), viral nervous necrosis (Yoshikoshi & Inoue, 1990), turbot encephalomyelitis (Bloch *et al.*, 1991) and fish encephalitis (Comps *et al.*, 1996) is a neuropathological condition affecting several fish species and caused by a few viral agents belonging to the *Nodaviridae* family.

The first detailed description of the disease was reported in 1988 by Bellance & Gallet de Saint-Aurin on the occasion of mass mortalities occurred in French Martinique involving hatchery-reared seabass (*Dicentrarchus labrax*) larvae and juveniles; however Glazebrook & Campbell (1987) had previously described in barramundi (*Lates calcarifer*) similar mortalities associated with brain lesions which in hindsight could probably be referred to betanodavirus infection.

Since then, this pathology has been observed in more than forty species from different geographical areas.

According to the Office International des Epizooties (OIE, 2006), all mass mortalities affecting marine fish species showing nervous symptoms and associated with the presence of small virus particles of the *Nodaviridae* family should be regarded as one single disease identified with the official denomination of viral encephalopathy and retinopathy (VER), also known as viral nervous necrosis (VNN).

AETIOLOGYMorphological and genomic characteristics

VER can be caused by a few viral agents previously identified as members of the *Picornaviridae* family (Glazebrook *et al.*, 1990; Bloch *et al.*, 1991; Breuil *et al.*, 1991) and capable to induce similar nervous lesions in several species. Subsequently, according to the biochemical characterisation of the nucleic acid and the structural proteins obtained from viral agents isolated from striped jack *Pseudocaranx dentex* (Mori *et al.*, 1992) larvae and brain tissues of *Dicentrarchus labrax* and *Lates calcarifer* (Comps *et al.*, 1994), these agents have been definitively included in the *Nodaviridae* family (Schneemann *et al.*, 2005) which is composed of two genera: the *Alphanodavirus* genus, which primarily infects insects such as Nodamura Virus (NOV), Blackbeetle Virus (BBV), Flock House Virus (FHV), Boolarra Virus (BOV) (Schneemann & Marshall, 1998), and the *Betanodavirus* genus which includes four species affecting fish (Carstens *et al.*, 2000; Schneemann *et al.*, 2005). Agents belonging to *Betanodavirus* genus are small (25-30 nm), non-enveloped and are characterized by icosahedral morphology (Glazebrook *et al.*, 1990; Bloch *et al.*, 1991). Their genome consists of two single-stranded, positive-sense non-polyadenylated RNA molecules: RNA1 (3.1 Kb) encodes the non-structural protein A (100 Kda) a viral part of the RNA-dependent RNA polymerase and the RNA2 (1.4 Kb) that contains an ORF sequence, encoding the capsid protein (44×10^3 Da) (Mori *et al.*, 1992; Comps *et al.*, 1994). In addition to RNA1 and RNA2 a third RNA molecule (RNA3) already described in alphanodaviruses has been recently proposed for betanodavirus too. As in the case of alphanodaviruses the RNA3 molecule has been found only in infected cell cultures possibly synthesized from RNA1 during virus replication (Iwamoto *et al.*, 2001a; Sommerset & Nerland, 2004).

Most knowledge concerning the molecular structure and the biology of betanodaviruses have been obtained studying alphanodaviruses isolated from insects, which although are

similar in the organisation of the genome and in certain physical properties, differ from the betanodaviruses primarily in the RNA genomic sequence and in the synthesis of the capsid protein. In fact cellular transfection experiments have shown that the betanodavirus capsid protein weighs less than the one of alfanodaviruses (37 Kda) and does not undergo the autocatalytic proteolysis process during the maturation of the pro-virions into infecting virions as occurs in alphanodaviruses (Delsert *et al.*, 1997a; 1997b).

An alignment between the capsid protein gene of SJNNV and four distinct alphanodaviruses revealed low similarity (<30%). Similar results have been obtained with the alignment of the aminoacid sequences of the capsid protein (<11%) (Nishizawa *et al.*, 1995b; Nagai & Nishizawa, 1999) whereas the homology observed between different betanodaviruses is quite high at both the nucleotide (> 75%) and aminoacid (80%) levels (Nishizawa *et al.*, 1995b; Sideris *et al.*, 1997). These results clearly demonstrate the low homology existing between insect and fish nodaviruses and simultaneously underline the high homology existing between betanodaviruses.

Serological analysis has recently led to the description of three serotypes. Serotype A and B are related respectively with genotypes SJNNV and TPNNV; serotype C shows correlation with genotypes RGNNV and BFNNV, in agreement with the elevated homology of the RNA2 sequences of these two genotypes (Mori *et al.*, 2003).

Taxonomic characterisation and phylogenetic analysis

The betanodaviruses so far isolated have been generally identified with reference to the species of origin followed by the acronyms EV (encephalitis virus), NNV (nervous necrosis virus) or NV (nodavirus).

Although each host species is usually affected by single, species-specific viral agents, cases in which one host can be infected by distinct isolates have also been reported, such as in *Dicentrarchus labrax* (Thiery *et al.*, 1999a).

On the basis of the phylogenetic analysis of the T4 variable region that encodes the virus capsid protein, betanodaviruses have been clustered in four genotypes that coincide with the four species so far officially identified (table 1): TPNNV, SJNNV, BFNNV and RGNNV, (Nishizawa *et al.*, 1995b; 1997; Dalla Valle *et al.*, 2001; Thiery *et al.*, 2004). The isolates belonging to genotypes SJNNV and TPNNV were obtained respectively from striped jack (*Pseudocaranx dentex*) and tiger puffer (*Takifugu rubripes*). Genotype RGNNV, an acronym of the English name, *Epinephelus akaara*, red-spotted grouper, includes isolates from a significant number of warm water fish species (Skirris *et al.*, 2001), whereas the virus isolates obtained from cold water fish are generally classified in the cluster BFNNV, whose prototype was originally detected in barfin flounder (*Verasper moseri*) (Dannevig *et al.*, 2000; Grotmol *et al.*, 2000; Starkey *et al.*, 2001), with the exception of one isolate originated from turbot (TNV) for which the inclusion in a fifth genotype has been proposed (Johansen *et al.*, 2004b).

The phylogenetic analysis of the known genotypes has shown a clear point of divergence of TPNNV and SJNNV from BFNNV and RGNNV genotypes. Considering a molecular evolution rate of 2.6×10^{-3} nucleotide substitutions/site/year (Li *et al.*, 1988) this divergence can be dated back to around 100-150 years ago. Furthermore minor divergences occurred in each cluster during the last 10 years, probably favoured by the growth of aquaculture activities that increased remarkably in the same period (Nishizawa *et al.*, 1997).

All the Japanese viral isolates belonging to the genotype RGNNV are considered as progenies of one ancestral strain originally isolated from Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*); this hypothesis is supported by the wide distribution of this species, which is farmed in significant numbers and distributed as juveniles to several aquaculture rearing facilities over a wide geographical area. Moreover, considering that a second isolate obtained

from the same species belongs to the genotype TPNNV, which is the more distant cluster from RGNNV, it has been hypothesised that the Japanese flounder must have played a key role in the spread of VER (Nishizawa *et al.*, 1997).

Species in the Genus	Tentative Species in the Genus
Barfin flounder nervous necrosis virus (BFNNV)	Atlantic cod nervous necrosis virus (ACNNV)
Red spotted grouper nervous necrosis virus (RGNNV)	Atlantic halibut nodavirus (AHNV)
Striped jack nervous necrosis virus (SJNNV)	Dicentrarchus labrax encephalitis virus (DIEV)
Tiger puffer nervous necrosis virus (TPNNV)	Dragon grouper nervous necrosis virus (DGNNV)
	Greasy grouper nervous necrosis virus (GGNNV)
	Grouper nervous necrosis virus (GNNV)
	Halibut nervous necrosis virus (HNNV)
	Japanese flounder nervous necrosis virus (JFNNV)
	Lates calcarifer encephalitis virus (LcEV)
	Malabaricus grouper nervous necrosis virus (MGNNV)
	Seabass nervous necrosis virus (SBNNV)
	Umbrina cirrosa nodavirus (UCNV)

Table 1 - List of species in the genus *Betanodavirus* (Schneemann *et al.*, 2005).

As regards the geographical distribution of the disease, a European origin has been hypothesised for isolates belonging to genotypes BFNNV and RGNNV, whereas a Pacific origin has been postulated for isolates included in genotypes TPNNV and SJNNV. The isolates belonging to the genotype SJNNV probably reached Europe through trade of ornamental fish, and gradually adapted to both the local warm and cold water species (Aspehaugh *et al.*, 1999). It may also be postulated that after adapting to their new environment and new species, the same viral isolates returned to the Pacific through the exportation of whitefish and salmonids (Aspehaugh *et al.*, 1999; Skliris *et al.*, 2001).

It may be very reasonably believed that the molecular evolution of betanodaviruses has been significantly influenced by temperature with adaptation to different or even identical species living in geographical areas characterized by different temperatures (Totland *et al.*, 1999). This hypothesis is supported by the identification of two, genotypically distinct, isolates: the first capable of inducing the disease in seabass farmed on the Atlantic coast, the second one causing the disease in subjects belonging to the same species but farmed in the Mediterranean where temperatures are significantly higher (Thiery *et al.*, 1999a). Furthermore, the genomic homology between viral isolates originating from species native to Oriental and Australian waters and viral isolates obtained from Mediterranean fish suggests the possibility of a parallel-convergent evolution rather than a continuous exchange of strains between different geographical areas as another explanation (Dalla Valle *et al.*, 2001).

An additional hypothesis on the spreading of betanodaviruses considers the use of a live dietary component, such as *Artemia salina*, *Tigriopus japonicus* and *Acetesinte medius* (Chi

et al., 2003). These organisms might act as carriers and easily spread the disease over great distances. This would justify the identification of very similar isolates in hosts farmed far away from one another, such as in the case of the isolates obtained from *Hippoglossus hippoglossus* in Norway and from *Verasper moseri* in Japan (Grotmol *et al.*, 1995; Muroga, 1995).

On the basis of a phylogenetic study on nine viral strains originating from the Mediterranean area, Dalla Valle *et al.* (2001) hypothesised the existence of a common ancestral strain hosted in *Dicentrarchus labrax*.

HOSTS AND GEOGRAPHICAL DISTRIBUTION

VER has been observed in many geographical regions and is considered a serious economic threat to marine aquaculture industry, especially wherever more susceptible species are reared (Le Breton *et al.*, 1997; Munday & Nakai, 1997; Munday *et al.*, 2002). To date, the disease has been described in over forty species belonging to different orders primarily of marine origin (table 2), and this number is likely to rise in the future with the intensification of aquaculture activity and closer monitoring, including ornamental species (Gomez *et al.*, 2006).

Furthermore some important species considered until recently completely resistant, such as seabream (*Sparus aurata*), are now seriously threatened, because of the recent appearance of some worrying outbreaks (Beraldo *et al.*, 2007; Bovo *et al.*, results unpublished).

The disease has been widely described in South-east Asia (Yoshikoshi & Inoue, 1990; Mori *et al.*, 1991; Nakai *et al.*, 1994; Nguyen *et al.*, 1994; Chua *et al.*, 1995; Danayadol *et al.*, 1995; Muroga, 1995; Fukuda *et al.*, 1996; Jung *et al.*, 1996; Chi *et al.*, 1997; Sohn & Park, 1998; Zafran *et al.*, 1998; Bondad-Reantaso *et al.*, 2000; Zafran *et al.*, 2000; Chi *et al.*, 2001; Lai *et al.*, 2001b; Oh *et al.*, 2002; Maeno *et al.*, 2002; Chi *et al.*, 2003; Hegde *et al.*, 2003), in the Mediterranean basin (Breuil *et al.*, 1991; Bovo *et al.*, 1996; Sweetman *et al.*, 1996; Le Breton *et al.*, 1997; Pavoletti *et al.*, 1998; Thiery *et al.*, 1999a; Athanassopoulou *et al.*, 2003; 2004; Maltese *et al.*, 2005), and in the North Sea (Bloch *et al.*, 1991; Grotmol *et al.*, 1995). Betanodavirus infection has recently been reported in fish farmed along the coastal waters of the United Kingdom (Starkey *et al.*, 2000; 2001), Israel (Ucko *et al.*, 2004), North America (Curtis *et al.*, 2001; Barker *et al.*, 2002; Gagnè *et al.*, 2004), Iran (Zorriehzahra *et al.*, 2005), and India (Azad *et al.*, 2005).

Despite the fact that the disease is considered typical of marine fish, VER has also been found in certain species reared in fresh water, such as *Anguilla anguilla* (Chi *et al.*, 2003), *Poecilia reticulata* (Hedge *et al.*, 2003), *Parasilurus asotus* (Chi *et al.*, 2003), *Acipenser gueldenstaedti* (Athanassopoulou *et al.*, 2004), *Tandanus tandanus* and *Oxyeleotris lineolatus* (Munday *et al.*, 2002). The disease has also been experimentally induced in Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*) (Skloris & Richards, 1999b) and more recently in juveniles and adults medaka (*Oryzias latipes*) (Furusawa *et al.*, 2006) in confirmation of the fact that salinity is not a determinant factor.

Order	Fish species	Geographical area
Anguilliformes	<i>Anguilla anguilla</i> (European eel)	Taiwan ¹
Gadiformes	<i>Gadus morhua</i> (Atlantic cod)	UK ² , Canada ³ , USA ⁴ , Norway ⁵⁰
	<i>Melanogrammus aeglefinus</i> (Haddock)	Canada ⁵
Perciformes	<i>Lates calcarifer</i> (Barramundi, Asian seabass)	Australia ⁶ , China ⁷ , Indonesia ⁸ , Israel ^{7,13} , Malaysia ⁹ , Philippines ¹⁰ , Singapore ¹¹ , Tahiti ¹² , Taiwan ¹ , Thailand ¹⁴ , India ¹⁵
	<i>Lateolabrax japonicus</i> (Japanese seabass)	Japan ¹⁶
	<i>Dicentrarchus labrax</i> (European seabass)	Caribbean ¹⁷ , France ¹⁸ , Greece ¹⁹ , Italy ²⁰ , Malta ²¹ , Portugal ²¹ , Spain ²¹ , Israel ¹³
	<i>Epinephelus aeneus</i> (White grouper)	Israel ¹³
	<i>E. akaara</i> (Red spotted grouper)	Japan ²² , Taiwan ²³
	<i>E. awoara</i> (Yellow grouper)	Taiwan ²⁴
	<i>E. coioides</i> (Orange-spotted grouper)	Philippines ¹⁰ , Taiwan ¹
	<i>E. fuscoguttatus</i> (Brown-marbled grouper)	Taiwan ²⁴
	<i>E. malabaricus</i> (Malabar grouper)	Thailand ²⁶
	<i>E. marginatus</i> (Dusky grouper)	Mediterranean ¹⁹
	<i>E. moara</i> (Kelp grouper)	Japan ²⁷
	<i>E. septemfasciatus</i> (Convict grouper)	Japan ²⁸ , Korea ²⁹
	<i>E. tauvina</i> (Greasy grouper)	Malaysia ³⁰ , Philippines ³⁰ , Singapore ³¹
	<i>Chromileptes altivelis</i> (Humpback grouper)	Indonesia ³² , Taiwan ¹
	<i>Latris lineata</i> (Striped trumpeter)	Australia ⁷
	<i>Pseudocaranx dentex</i> (Striped jack)	Japan ³³
	<i>Seriola dumerili</i> (Greater amberjack)	Japan ³⁴
	<i>Trachinotus blochii</i> (Snub nose pompano)	Taiwan ¹
	<i>Trachinotus falcatus</i> (Yellow-wax pompano)	Taiwan ¹
	<i>Sparus aurata</i> (Gilthead seabream)	France ³⁵ , Italy ³⁶
	<i>Sciaenops ocellatus</i> (Red drum)	Korea ³⁷ , Israel ¹³
	<i>Umbrina cirrosa</i> (Shi drum)	Italy ³⁸ , France ³⁹
	<i>Atractoscion nobilis</i> (White weakfish)	USA ⁴⁰
	<i>Oplegnathus fasciatus</i> (Japanese parrotfish)	Japan ⁴¹
	<i>Oplegnathus punctatus</i> (Rock porgy)	Japan ³³
	<i>Oxyeleotris lineolata</i> (Sleepy cod)	Australia ⁷
	<i>Rachycentron canadum</i> (Cobia)	Taiwan ¹
	<i>Mugil cephalus</i> (Grey mullet)	Israel ¹³
	<i>Liza aurata</i> (Golden grey mullet)	Iran ⁴²
	<i>Lutjanus erythropterus</i> (Crimson snapper)	Taiwan ¹
	Pleuronectiformes	<i>Verasper moseri</i> (Barfin flounder)
<i>Hippoglossus hippoglossus</i> (Atlantic halibut)		Norway ⁴³ , UK ⁴⁴
<i>Paralichthys olivaceus</i> (Japanese flounder)		Japan ⁴⁵
<i>Scophthalmus maximus</i> (Turbot)		Norway ⁴⁶
<i>Solea solea</i> (Dover sole)		UK ²
Tetraodontiformes	<i>Takifugu rubripes</i> (Japanese puffer fish)	Japan ²⁷
Siluriformes	<i>Parasilurus asotus</i> (Chinese catfish)	Taiwan ²⁵
	<i>Tandanus tandanus</i> (Australian catfish)	Australia ⁷
Cyprinodontiformes	<i>Poecilia reticulata</i> (Guppy)	Singapore ⁴⁷
Scorpaeniformes	<i>Sebastes oblongus</i> (Oblong rockfish)	Korea ⁴⁸
Acipenseriformes	<i>Acipenser gueldenstaedti</i> (Russian sturgeon)	Greece ⁴⁹

Table 2 – List of affected species and geographical area in which the disease occurred.

References: (1) Chi *et al.*, 2001; (2) Starkey *et al.*, 2001; (3) Johnson *et al.*, 2001; (4) Johnson *et al.*, 2002; (5) Gagnè *et al.*, 2004; (6) Glazebrook & Campbell, 1987; (7) Munday *et al.*, 2002; (8) Zafran *et al.*, 1998; (9) Awang, 1987; (10) Maeno *et al.*, 2002; (11) Chang *et al.*, 1997; (12) Renault *et al.*, 1991; (13) Ucko *et al.*, 2004; (14) Glazebrook *et al.*, 1990; (15) Azad *et al.*, 2005; (16) Jung *et al.*, 1996; (17) Bellance & Gallet de Saint-Aurin, 1988; (18) Breuil *et al.*, 1991; (19) Le Breton *et al.*, 1997; (20) Bovo *et al.*, 1999a; (21) Skliris *et al.*, 2001; (22) Mori *et al.*, 1991; (23) Chi *et al.*, 1997; (24) Lai *et al.*, 2001b; (25) Chi *et al.*, 2003; (26) Danayadol *et al.*, 1995; (27) Nakai *et al.*, 1994; (28) Fukuda *et al.*, 1996; (29) Sohn & Park, 1998; (30) Bondad-Reantaso *et al.*, 2000; (31) Chua *et al.*, 1995; (32) Zafran *et al.*, 2000; (33) Mori *et al.*, 1992; (34) Muroga, 1995; (35) Comps & Raymond, 1996; (36) Dalla Valle *et al.*, 2000; (37) Oh *et al.*, 2002; (38) Pavoletti *et al.*, 1998; (39) Comps *et al.*, 1996; (40) Curtis *et al.*, 2001; (41) Yoshikoshi & Inoue, 1990; (42) Zorriehzahra *et al.*, 2005; (43) Grotmol *et al.*, 1995; (44) Starkey *et al.*, 2000; (45) Nguyen *et al.*, 1994; (46) Bloch *et al.*, 1991; (47) Hedge *et al.*, 2003; (48) Kim *et al.*, 2001; (49) Athanossopoulou *et al.*, 2004; (50) Pantel *et al.*, 2007.

The high homology observed between the isolate obtained from *Epinephelus taurina* (ETNNV), a saltwater species, and the isolate (GNNV) obtained from *Poecilia reticulata*, a very common freshwater ornamental fish, suggests a possible marine origin for the infection detected in this freshwater species (Hedge *et al.*, 2003).

These observations raise concerns that further commercially important freshwater fish may be struck by the disease even after only accidental exposure to the causative agent.

In addition to agents affecting fish and insects the family *Nodaviridae* includes some agents which may induce serious infections in shellfish species too; reports from Taiwan, China, and the French West Indies, have confirmed the detection of a viral agent from the freshwater shrimp *Macrobrachium rosenbergii* suffering high mortalities due to white tail disease (Arcier *et al.*, 1999). Later on, Widada *et al.* (2003) identified this agent as a member of the *Nodaviridae* family. Experimental trials to induce the disease in *Penaeus indicus*, *Penaeus japonicus* and *Penaeus monodon* gave negative results (Sudhakaran *et al.*, 2006) suggesting these species should be considered resistant to the infection caused by the nodavirus agent isolated from *Macrobrachium rosenbergii*.

More recently, Pantoja *et al.* (2007) reported the identification of a nodavirus agent temporarily named LvNV (*Litopenaeus vannamei nodavirus*) in crustacea farmed in Belize.

The list of species affected by the disease or just susceptible to the infection, like some ornamental species (Gomez *et al.*, 2006), is continuously growing.

CLINICAL AND ANATOMO-PATHOLOGICAL SIGNS

Clinical signs

The clinical symptoms are a direct consequence of the lesions occurring in the central nervous system (CNS) and retina, and are primarily represented by an abnormal swimming behaviour that may be manifested in various ways mainly depending on the species and age. In bilaterally symmetrical fish, affected subjects may swim in straight lines and rapidly near the surface, perform extended circular movements while alternating long periods of ataxia and lethargic swimming with quick spinning. Some subjects briefly assume anomalous stationary positions, remaining in vertical position with the head or the caudal fin above the surface of the water. Often, subjects have been observed swimming so fast in a straight line near the surface that they were unable to stop before smacking into the walls of the tank and incurring traumatic lesions to the jaws.

Flatfish usually show less evident symptoms, and affected subjects may remain at length on the bottom bending their body with the head and tail raised; sometimes they lie on the bottom with the belly up. They may tremble before starting to swim for an extremely short

time before dropping to the bottom of the tank with a swaying motion that recalls “autumn leaves falling from a tree” (Perić, personal observation).

Loss of appetite has been frequently observed as well as a progressive change in pigmentation. The larvae of *Lates calcarifer* and *Hippoglossus hippoglossus* tend to lose colour, whereas juveniles of *Hippoglossus hippoglossus*, *Dicentrarchus labrax*, *Scophthalmus maximus* and *Epinephelus* spp. tend to assume a more intense pigmentation starting from the caudal fin (Bellance & Gallet de Saint-Aurin, 1988; Glazebrook *et al.*, 1990; Yoshikoshi & Inoue, 1990; Bloch *et al.*, 1991; Breuil *et al.*, 1991; Mori *et al.*, 1991; 1992; Boonyaratpalin *et al.*, 1996; Grotmol *et al.*, 1997b; Munday *et al.*, 2002).

The life stages during which symptoms and mortality are most frequently observed are linked to the infection route and the affected species (Munday & Nakai, 1997). Although the highest mortality rates have been most frequently observed in larvae and juveniles, serious losses have also been reported in adults, such as in *Pseudocaranx dentex* (Arimoto *et al.*, 1993; Mushiake *et al.*, 1994; Nguyen *et al.*, 1997), *Epinephelus septemfasciatus* (Fukuda *et al.*, 1996; Tanaka *et al.*, 1998) and *Dicentrarchus labrax* (Bovo *et al.*, 1996; Le Breton *et al.*, 1997). Severe losses occurred also in adult halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) and Atlantic cod (*Gadus morhua*) reared in Norway (Aspehaug *et al.*, 1999; Pantel *et al.*, 2007) which are usually affected during larval and juvenile stages (Grotmol, 2000; Johnson *et al.*, 2001).

The appearance of clinical symptoms can be significantly influenced by the temperature (Arimoto *et al.*, 1994; Fukuda *et al.*, 1996; Tanaka *et al.*, 1998). The first observations of the disease closely linked the presence of clinical symptoms and histological lesions to water temperatures of higher than 29-30°C typical of summer in tropical regions; for such reason, the disease was originally called “summer disease” (Bellance & Gallet de Saint Aurin, 1988). Subsequent observations revealed that natural infection and disease may occur in a wider temperature range.

Most affected fish belong to warm water species, such as *Epinephelus malabaricus*, in which mortality occurs between 28-30°C (Danayadol *et al.*, 1995) or *Pseudocaranx dentex* larvae, which are fatally affected between 20-26 °C (Arimoto *et al.*, 1994).

Fukuda *et al.* (1996) reported that an increase in temperature is a predisposing factor for the disease, while obviously referring to warm water species, even if infection has also been observed in cold water species like *Hippoglossus hippoglossus* (Grotmol *et al.*, 1995) and *Verasper moseri*, which commonly display symptoms at 4-5°C. Following intramuscular inoculation of *Epinephelus septemfasciatus* and *Epinephelus akaara* with homogenate of brain and eye obtained from infected subjects, Tanaka *et al.* (1998) concluded that both mortality and symptoms are significantly affected by water temperature after observing the highest mortality and the shortest incubation period at temperatures higher than 28°C.

In European seabass (*Dicentrarchus labrax*), typical clinical signs which are very clear at temperatures of more than 23-25°C tends to decrease as soon as the temperature falls beneath 18-22°C (Sweetman *et al.*, 1996; Bovo *et al.*, 1999a); more rarely, VER outbreaks can occur at lower temperatures between 14-15°C with few or unapparent symptoms (Galeotti *et al.*, 1999; Borghesan *et al.*, 2003). Similar observations have also been reported in *Epinephelus septemfasciatus* (Tanaka *et al.*, 1998).

Moreover, the disease may assume particularly serious development when water temperature fluctuates daily to such degree as to compromise virus defence mechanisms (Fukuda, unpublished data).

Totland *et al.* (1999) showed that one particular Japanese virus strain known to be virulent for *Pseudocaranx dentex* larvae, a fish species that prefers high water temperatures, was unable to replicate in the larvae of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*), a cold-water fish. On the other hand, this latter species can be infected by a virus strain isolated in Norway that is, for some reason, unable to replicate in *Pseudocaranx dentex* larvae.

Anatomopathological lesions

Hyperinflation of the swim bladder has been frequently reported from different species as in *Dicentrarchus labrax*, *Lates calcarifer* and *Pseudocaranx dentex* (Breuil *et al.*, 1991; Munday *et al.*, 2002) particularly during larval stages. On some occasions, a depigmented area in the cranium skin overhanging the brain and wide open opercula have been reported, together with lesions of the jaws and reddening of the area around the head of probable traumatic origin (Bovo *et al.*, 1996; Sweetmann *et al.*, 1996; Le Breton *et al.*, 1997; Pavoletti *et al.*, 1998) (figure 1). No other significant lesions have been recorded during natural outbreaks.

Histopathological lesions

The most typical findings detected in clinically affected fish from different species consist of vacuolation and necrosis of nervous cells.

The lesions may be detected in different parts of the brain (mesencephalon, metencephalon, telencephalon, medulla oblongata) (figure 2), spinal cord, granular layers of the retina (figure 3), cones and rod cells and near the germinal epithelium (Munday *et al.*, 1992; Grotmol *et al.*, 1995; Comps & Raymond, 1996; Grove *et al.*, 2003).

In Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) suffering high mortalities during natural VER infection endocardial lesions have been detected in addition to the typical vacuolar lesion normally found. According to the authors the presence of these lesions suggests that viremia may be an important factor in the pathogenesis of VER at least in Atlantic halibut (Grotmol *et al.*, 1997b). The vacuolations observed in the CNS were scattered mainly in the *optic tectum*, while according to Le Breton *et al.* (1997) most of the vacuolating lesions observed in seabass are mainly evident in the telencephalon, diencephalon and the cerebellum.

The number and size of the vacuoles may vary considerably depending on the species affected and especially the age; the most serious lesions are observed in larval and juvenile stages in which vast areas of the CNS (Glazebrook *et al.*, 1990; Breuil *et al.*, 1991) may be affected. Generally speaking, both intra- and extra-cellular vacuoles are most numerous in the metencephalon and in the deep granular layer of the retina, even if significant presence is observed in the spinal cord, especially in the area overlying the swim bladder (Galeotti *et al.*, 1999).

Evident lesions have also been observed in the spinal ganglia of *Oplegnathus fasciatus* (Yoshikoshi & Inoue, 1990). Further lesions reported include cellular pyknosis and basophilia (Yoshikoshi & Inoue, 1990); focal pyknosis, karyorectic neurons and infiltration of mononuclear cells (Grotmol *et al.*, 1995). Basophilic inclusions have been observed in nerve cells of *Lates calcarifer*, *Dicentrarchus labrax* and *Epinephelus malabricus* (Glazebrook *et al.*, 1990; Breuil *et al.*, 1991; Boonyaratpalin *et al.*, 1996) furthermore cerebral blood vessels lesions have been described (Le Breton *et al.*, 1997).

In adult seabass, the disease shows much less evident symptoms and histopathological lesions (Galeotti *et al.*, 1999). Generally speaking, lesions are much less severe in adult specimens than those described in larval and juvenile stages, given that it is not always easy to identify the characteristic vacuolisations. The lesions of the retina, on the other hand, tend to be more consistent in adults. The inflammatory process is usually very discreet, and the presence of macrophages is probably secondary to vacuolisation.

Vacuolisation of the hindgut mucosa, with hyaline droplet formation with occasional epithelial sloughing have also been reported (Glazebrook *et al.*, 1990).

Histopathological changes sometimes observed concurrently with nodavirus outbreaks in liver, kidney, heart, intestine, and the skeletal musculature need not necessarily be linked to betanodavirus infection (Johansen *et al.*, 2004a).

Sub-clinical infection

Even if asymptomatic carriers are considered the major source of infection, the mechanisms that modulate their resistance and control the viral replication have not yet been adequately documented. According to Johansen *et al.* (2004a) who investigated the progression of AHNNV infection the virus has been detected in the CNS of survivors the natural infection, during the whole one year study period, by immunohistochemistry (IHC), polymerase chain reaction (PCR) and cell culture isolation method. These results suggest that at least as far as *Hypoglossus hippoglossus* is concerned, the carrier status period may last for a long time. The detection of the virus in both male and female gonads and eggs from different species (Arimoto *et al.*, 1992; Mushiake *et al.*, 1994; Nishizawa *et al.*, 1996; De Mas *et al.*, 1998; Dalla Valle *et al.*, 2000) support the hypothesis of a throe vertical transmission of the disease from infected broodfish to their offspring. Using the immunofluorescent antibody test (IFAT), Nguyen *et al.* (1997) detected in adult striped jack (*Pseudocaranx dentex*) the presence of the virus in gonads and other organs, such as the intestine, stomach, kidney and liver, whereas the CNS tested completely negative. In *Hypoglossus hippoglossus*, viral particles have been observed in nerve cells, astrocytes, oligodendrocytes, microgliaocytes, macrophages, lymphocytes, vascular epithelium, and cardial and epicardial endothelium and mesothelium (Grotmol *et al.*, 1997b). Nodavirus-like particles have also been observed in the endocardium from Atlantic salmon (*Salmo salar*) affected by myocardial syndrome (CMS) (Grotmol *et al.*, 1997a).

Using RT-PCR, Dalla Valle *et al.* (2000) detected the presence of betanodavirus genome in asymptomatic *Sciaena umbra* and *Sparus aurata*. The positive result concerning the latter species has been confirmed by different authors (Comps & Raymond, 1996; Dalla Valle *et al.*, 2000; Castric *et al.*, 2001) and suggests this species could play a key role as healthy carrier in the epidemiology of VET in the Mediterranean area where *Dicentrarchus labrax* is the main target host. Experimental studies have shown that several species may act as asymptomatic carriers (Glazebrook, 1995; Skliris & Richards, 1999a; Johansen *et al.*, 2003).

An additional risk posed to farmed species is represented by the presence in the environment of wild susceptible species, which may maintain the infection in latent state while permitting the survival of the virus in the surroundings, in this way creating a dangerous source of infection.

In Canada, certain populations of wild fish are suspected of acting as authentic natural reservoirs, and in fact, the virus has been shown by polymerase chain reaction technique (PCR) to be present in 0.23% of wild *Pleuronectes americanus* (Barker *et al.*, 2002). A subsequent study performed in Japan on a representative sample of 30 species taken from bays in Yashima (Kagawa Prefecture) and Tamanoura (Nagasaki Prefecture) confirmed that most farmed and wild fish tested positive, even if no clinical symptoms at all were evident at the moment of capture (Gomez *et al.*, 2004). In the Mediterranean basin the presence of VET infection has been confirmed in certain wild species (Ciulli *et al.*, 2006b). The infection seems to be particularly frequent in red mullet (*Mullus barbatus barbatus*), in which 28.8% prevalence was found (Maltese & Bovo, results not published).

It is therefore clearly evident that despite some existing data, the need for further knowledge on the carrier status and the mechanisms of disease transmission should obtain paramount attention, especially in regard to the major farmed species, if disease control strategies are to be significantly improved.

DISEASE TRANSMISSION

Several observations from the field and the results obtained from experimental trials performed by different authors under controlled conditions (Glazebrook *et al.*, 1990; Mori *et al.*, 1991; Arimoto *et al.*, 1993; Nguyen *et al.*, 1994; 1996; Thiery *et al.*, 1997; Grotmol *et al.*, 1999; Peducasse *et al.*, 1999; Totland *et al.*, 1999) completely support the horizontal transmission route; while the possibility for vertical transmission has also been proposed for some species (Nguyen *et al.*, 1997; Breuil *et al.*, 2002; Johansen *et al.*, 2002).

Tissue tropism

The histopathological lesions associated to betanodavirus infection clearly demonstrate that these agents have a marked primary neurotropism with major replication sites in the CNS and retina.

Pathogenetic studies carried out in different species at various life stages have enabled the formulation of several hypotheses on the ways in which the virus reaches its replication sites after penetrating the host.

According to Nguyen *et al.* (1996) one of the initial viral replication sites in *Pseudocaranx dentex* larvae is the spinal cord, from here; the virus could reach first the brain and then the retina by travelling up the optic nerve. In adult carrier fish the same authors detected, by IFAT, the presence of viral antigens in the gonads, intestine, stomach, kidney and liver, but not in the CNS and retina in this way suggesting a major difference between carrier and clinically affected fish. The positivity found in the viscera reinforces the hypothesis on the offspring contamination through the shedding of virus with gonadal and intestinal products (Nguyen *et al.*, 1997). Furthermore the detection of viral antigens in the olfactory lobes suggests that nasal cavity might also offer a possible point of viral entry (Mladineo, 2003).

An additional hypothesis considers the stratified epithelium of the foregut to be a primary virus replication site. This region, in fact, comes easily into contact with the virus present in the water or foods ingested, and from here, through the cranial nerves, the virus could easily reach the brain and the eye (Munday *et al.*, 1992; Grotmol *et al.*, 1999).

According to Peducasse *et al.* (1999) the gills and skin region near the lateral line are the principal penetration viral routes.

Horizontal transmission

Numerous experimental studies using larval or juveniles from different fish species as models have confirmed the horizontal transmission route. In some cases, the environmental conditions needed for the development of the pathology, such as the temperature and the age of the fish, were tested simultaneously.

The disease has been shown to be transmitted through the cohabitation of healthy and infected larvae in *Lates calcarifer* (Glazebrook *et al.*, 1990). Following experimental infection by bath and intra-peritoneal inoculation *Epinephelus akaara* juveniles developed the disease 10-14 days after exposure, showing histopathological damages similar to those occurring during natural disease but associated with lower mortality rates (Mori *et al.*, 1991).

In *Pseudocaranx dentex*, the disease was induced in healthy larvae through bath or cohabitation with infected larvae (Arimoto *et al.*, 1993; Nguyen *et al.*, 1996). By adopting the same infection methods VER was also transmitted to *Paralichthys olivaceus* juveniles (Nguyen *et al.*, 1994).

In *Epinephelus malabaricus*, the disease was transmitted by intra-peritoneal injection of infected material. The clinical signs were comparable to those occurring during the natural disease; the induced mortality rate was 40-60%. In this species, the pathology never

underwent an acute phase in either natural or experimental conditions, while in stressful situations it appears to be common (Boonyaratpalin *et al.*, 1996).

Thiery *et al.* (1997) reported a 28% mortality rate in *Dicentrarchus labrax* juveniles following intramuscular inoculation of infected brain homogenate.

Peducasse *et al.* (1999), demonstrated that oral or bath infection or infection by cohabitation leads in *Dicentrarchus labrax* to a sub-acute form characterized by slight nervous disorders associated with low mortality. According to the same authors more evident nervous disorders and an acute form characterized by higher mortality may be obtained following intramuscular inoculation. It is therefore obvious that both the infectious dose and the virulence of the strain are key factors in pathogenesis.

The high resistance of betanodaviruses to environmental conditions (Frerichs *et al.*, 2000; Maltese & Bovo, 2001; Munday *et al.*, 2002) undoubtedly contributes to increase horizontal transmission probability, above all in endemic areas, and this occurs particularly when the juveniles are transferred from hatcheries to ongrowing facilities.

Vertical transmission

According to some authors, vertical transmission may represent an important virus spreading route in farmed populations (Arimoto *et al.*, 1992; Yoshimizu *et al.*, 1997; Breuil *et al.*, 2002).

Although vertical transmission is strongly suspected because of clear epidemiological data showing the high prevalence of the infection in the very earliest larval stages and in the juveniles of various species reared in farms provided with water treatment (Breuil *et al.*, 1991; Arimoto *et al.*, 1992; Comps *et al.*, 1996; Yoshimizu *et al.*, 1997; Grotmol & Totland, 2000), it has not yet been effectively demonstrated. Vertical transmission has been hypothesised because of the observation of the viral agent in the gonads and fertilised eggs of *Pseudocaranx dentex* by means of ELISA (Arimoto *et al.*, 1992), RT-PCR (Mushiake *et al.*, 1994; Nishizawa *et al.*, 1996; Dalla Valle *et al.*, 2000; Breuil *et al.*, 2002) and IFAT (Nguyen *et al.*, 1996; 1997); furthermore, the virus has been identified in fertilised eggs and larvae originating from experimentally infected broodfish (Breuil *et al.*, 2002). These data suggest that even if the disease might be transmitted from broodfish to their offspring, it is not yet clear whether real intra-ovarian transmission is involved or whether an external contamination may occur and transmit the infection to young larvae at the moment of hatching.

Other transmission routes

In 1998, Skliris & Richards considered the possibility that *Artemia salina* and the rotifer *Brachionus plicatilis*, fresh feeds commonly used in marine aquaculture facilities for larvae, might represent natural nodavirus reservoirs and therefore play a key role in the transmission of the disease. The negative outcome of the virological tests performed by infecting SSN-1 cell cultures with homogenates of these two invertebrates and the absence of virus-like particles from their organs convinced the authors that the risk in this case existed only at the level of mechanical carrier following superficial contamination. Chi *et al.* (2003) also considered the possibility that a diet based on *Artemia salina*, *Tigriopus japonicus* and *Acetesinte medius*, from which the virus has been isolated, might represent an infection source.

An additional possibility for transmission of the disease might be represented by feeding using raw fish (Mori *et al.*, 2005) a practice that is mainly used for the broodstock. Furthermore cannibalism could represent a common route for disease transmission in nature.

IMMUNE RESPONSE

The studies and the information currently available on the immune response of fish affected by VER are unfortunately very limited. The disease often appears precociously, particularly in the earliest larval stages characterized by high mortalities, which might be reasonably ascribed to deficiencies of the immune system not yet completely developed. Adult fish instead may usually provide an adequate response to the infection; nevertheless serious losses associated to clear symptoms have been often detected in adult fish too (Arimoto *et al.*, 1993; Mushiake *et al.*, 1994; Bovo *et al.*, 1996; Fukuda *et al.*, 1996; Le Breton *et al.*, 1997; Nguyen *et al.*, 1997; Tanaka *et al.*, 1998; Aspehaug *et al.*, 1999). In *Hippoglossus hippoglossus* it has been demonstrated that fish surviving the infection may become carriers for a relatively long time (Johansen *et al.*, 2004a). In a few occasions, even if specific symptoms were still present, the virus was not always detectable, mainly because of its very low concentration, tending to disappear completely after recovery (Fukuda *et al.*, 1996).

Preliminary studies following experimental infection or administration of inactivated or recombinant vaccines have enabled the detection of specific antibodies in infection-resistant subjects (Breuil & Romestand, 1999; Tanaka *et al.*, 2001; Yamashita *et al.*, 2005; Thiery *et al.*, 2006). According to Grove *et al.* (2003) the antibody response occurs only when the experimental infection is provided by intra-peritoneal inoculation and not by immersion (Grove *et al.*, 2003), nevertheless the immune response occurring following a natural outbreak may persist at high level for one year or even more (Johansen *et al.*, 2004a).

In one study performed in immuno-competent Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) inoculated with AHNNV a clear immune response has been detected in the plasma starting from day 18 p.i. until day 56 p.i. during which a continues increase of the antibody activity has been observed. Further results suggest that the presence of infectious virus in the CNS may elicit a local antibody production by plasma cells (Grove *et al.*, 2006)

DIAGNOSTIC METHODS

VER has been for a long period diagnosed on the basis of the characteristic clinical symptoms associated with the presence of vacuolar lesions in the CNS and the retina. The availability of the first cell line (SSN-1) susceptible to betanodavirus replication provided a valid diagnostic tool (Frerichs *et al.*, 1996). Later on further cell lines useful for diagnostic and research purposes were developed (Chi *et al.*, 1999a; Watanabe & Yoshimizu, 1999; Iwamoto *et al.*, 2000; Chang *et al.*, 2001; Lai *et al.*, 2001a; 2003). In addition, molecular biology tests were adopted in the early '90s.

According to the OIE diagnostic manual (2006), the screening of asymptomatic fish should be performed by isolation of the causative agent in SSN-1 or E-11, a clone derived from SSN-1 cells, followed by identification by means of IFAT or RT-PCR. In case of clinical suspicion direct detection of the virus by IFAT, IHC or RT-PCR may be used in addition to the virus isolation method.

Above and beyond the recommendations in the OIE manual, several diagnostic methods and different applications are reported in the current literature.

Histopathology and immunohistochemistry

Histopathological examinations cannot, unfortunately, be considered a valid diagnostic tool both because reports concerning juvenile subjects characterised by the scarcity or complete absence of specific lesions have been described (Bovo *et al.*, 1996; Galeotti *et al.*,

1999) and because the vacuolar lesions even if associated with the disease, although highly indicative of the same, cannot be considered pathognomonic. On the other hand, it is widely known that IHC represents an extremely useful diagnostic and research tool (Mutinelli *et al.*, 1998; Grove *et al.*, 2003; Johansen *et al.*, 2004b). In fact the application of IHC permits a clear identification of the viral antigens in the cytoplasm of degenerated cells (figure 4) and in the spongy lesions of both the CNS and the retina. IHC may be also applied to investigate on previous infection. This situation has been recently observed in fry weighing approximately three grams that tested positive following IHC analysis without showing any nervous symptoms or characteristic histopathological lesions referred to nodavirus infection (Galeotti *et al.*, 1999). The positivity revealed by IHC in the absence of histopathological lesions might indicate either a limited viral pathogenicity or a convalescent phase in which the rare positive cells observed represent the residual virus in subjects surviving the acute phase of the disease (Galeotti *et al.*, 1999).

When only rare positive cells are detected by IHC in brain sections, better response should be obtained including the eyes and looking at the retina which is described as a site of frequent viral antigen presence (Galeotti *et al.*, 1999; Mladineo, 2003).

Electron microscopy

Because betanodaviruses are small-sized viruses (25-30 nm), their direct observation by electron microscopy (EM) in pathological material may be difficult especially when present in limited concentration. This difficulty is also due to the limited sensitivity of the method. In clinically affected fish, especially when larvae and juveniles are involved, the high concentration of virus particles makes diagnosis easier. In EM preparations, the virions either appear free in the cytoplasm or associated to the endoplasmic reticulum membranes. The membranes of the mitochondrial internal crests appear to be completely destroyed, whereas the plasmatic membranes remain intact. In some cases, viral particles have been observed inside the cytoplasm in the form of para-crystalline aggregates (Figure 5) (Glazebrook *et al.*, 1990; Bloch *et al.*, 1991; Breuil *et al.*, 1991; Boonyaratpalin *et al.*, 1996; Grotmol *et al.*, 1997b).

Virions are observed primarily in nerve cells, astrocytes, oligodendrocytes and microgliaocytes (Yoshikoshi & Inoue, 1990; Grotmol *et al.*, 1997b). In Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*), however, viral particles were observed also in the endothelial cells, in the lymphocytes near the endocardium, in cardiac myocytes, and in the epicardium cells (Grotmol *et al.*, 1997a).

Cell culture isolation

Cell culture is the most important tool currently available for the isolation, replication and identification of animal viruses. Until 1993, over 150 cell lines (Fryer & Lannan, 1994) were used for the isolation and identification of pathogenic fish viruses, most of which derived from freshwater fish tissue and only a small part from saltwater fish. Immediately after the appearance of VER, numerous attempts were made to isolate the virus using the principle existing cell lines (Watanabe & Yoshimizu, 1999), but none of them were successful. In 1996, Frerichs *et al.* succeeded in replicating the virus in a cell line that originated in 1991 from striped snakehead fish fry (*Ophiocephalus striatus*) called SSN-1. This cell line is not so easy to maintain and in addition it is persistently infected by a Type-C retrovirus known as SnRV (Frerichs *et al.*, 1991; Hart *et al.*, 1996). In order to remediate the use of this contaminated cellular substrate, six cellular clones were created from SSN-1 (A6, B7, C3, E2, E9, E11) and their susceptibility in regard to the four official betanodavirus genotypes have been assessed (Iwamoto *et al.*, 2000). Unfortunately, all the three clones that proved most permissive to the development of the cytopathic effect (A6, E9, and E11) still tested

positive, by PCR and EM, for the presence of SnRV. This result suggests that the contaminating retrovirus may play an important role in the replication of the virus in the SSN-1 cells and the clones derived (Lee *et al.*, 2002), probably by inducing the production of a specific membrane receptor capable of promoting the adhesion of the nodavirus to the single cells. No cell cultures originated from seabass (*Dicentrarchus labrax*) gonads, larvae, fins, or brain tissue apparently free from retroviruses, in fact, proved susceptible to a reference strain isolated from seabass (personal observations by the authors).

Further betanodavirus susceptible cell lines have subsequently been developed, such as GF-1 derived from fin tissues of *Epinephelus coioides* (Chi *et al.*, 1999a; 1999b), SF, derived from larvae of *Lates calcarifer* (Chang *et al.*, 2001), GB, originating from brain of *E. awoara* (Lai *et al.*, 2001b; 2003), TF from *Scophthalmus maximus* (Aranguren *et al.*, 2002), and GS, derived from the spleen of *E. coioides* (Qin *et al.*, 2006). A cell line known as BB originated from the brain of barramundi (*Lates calcarifer*) persistently infected with a VER isolate has recently been developed. This cell line might offer a valid model for the study of virus infection and replication mechanisms both *in vivo* and *in vitro* (Chi *et al.*, 2005).

Additional information on the capacity of nodavirus strains isolated from seabass to replicate in cell cultures has been obtained by studying the lytic cycle in three fish cell lines (SBL, RTG-2, BF-2) and one mammal cell line (Cos1) (Delsert *et al.*, 1997b). The fish cells were more permissive than those of the mammal, in this way demonstrating that unlike insect nodaviruses, betanodaviruses are not capable of replicating in many cell cultures. Furthermore, whereas the insect nodaviruses infect a large quantity of tissues in diseased insects, betanodaviruses possess a more specific tropism for nerve cells.

In SSN-1 cells, the cytopathic effect appears on the 3rd day post infection and is characterized by the appearance of intracellular vacuolar lesions unevenly distributed throughout the cell monolayer. These vacuolar lesions initially are isolated and began assuming the form of vacuolized cellular aggregates after the passage of hours (figure 6). Seventy-two hours post infection, their number and size increase considerably and the cellular monolayer is gradually replaced by cellular lysis until a complete destruction.

Subsequent studies have shown that SSN-1 cells can also be useful to differentiate genotypes characterized by different optimal growth temperatures (Totland *et al.*, 1999). It has been indeed possible to classify, in four groups, seventeen different isolates originating from thirteen saltwater fish according to the specific cytopathic effect induced on SSN-1 cells (Iwamoto *et al.*, 1999).

The first group, including nine viral isolates belonging to genotype RGNNV and originated from *Epinephelus akaara*, *E. septemfasciatus*, *E. mooara*, *E. coioides*, *Dicentrarchus labrax*, *Lates calcarifer*, *Oplegnathus punctatus*, *Paralichthys olivaceus*, induced three days post infection a cytopathic effect characterized by round, granular cells with cytoplasmic vacuoles that led to the complete destruction of the monolayer within the 6th day.

The second group including viral isolates belonging to genotype SJNNV obtained from *Pseudocaranx dentex* induced a cytopathic effect characterised by small, round, granular and refractive cells without any consistent vacuolisation.

The third group, represented by one single isolate of the genotype TPNNV obtained from *Takifugu rubripes*, and the fourth group, consisting of viral isolates belonging to genotype BFNNV (four originating from *Paralichthys olivaceus*, one obtained from *Gadus macrocephalus* and one from *Hippoglossus hippoglossus*) induced the appearance of a cytopathic effect similar to the one caused by strains belonging to RGNNV genotype but only at 20°C, while at higher temperatures no cytopathic effect may be detected. In addition to the differences observed in cytopathic effect morphology, in fact, different viral strains displayed different optimum replication temperatures, according to their belonging genotype:

15-20°C for BFNNV, 20°C for TPNNV, 20-25°C for SJNNV and 25-30°C for RGNNV (Iwamoto *et al.*, 2000).

These data are extremely important for diagnostic purposes because they underline the need for incubation of the inoculated monolayers at different temperatures whenever the epidemiological knowledge indicates the presence of different genotypes in the same area.

Enzyme-linked Immunosorbent Assay

Several authors reported interesting results from application of different applications of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) tests primarily adopted for the detection of betanodavirus antibody activity (Mushiake *et al.*, 1992, Nishizawa *et al.*, 1995a; Breuil & Romestad, 1999; Breuil *et al.*, 2000; Watanabe *et al.*, 2000; Breuil *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 2001; Husgarð *et al.*, 2001; Lai *et al.*, 2001a; Grove *et al.*, 2003). The limitations of this test above all regard the lack of correlation often observed between the detection of specific antibodies and the disease status; in fact fish tested positive for the presence of the virus may test negative for antibody detection and vice-versa (Husgarð *et al.*, 2001).

Nevertheless according to different authors ELISA may be very useful for identification and selection of carriers fish among the broodstock; in fact investigations on ovary tissues revealed a significant virus prevalence despite negative results obtained from brain tissues belonging to the same population (Arimoto *et al.*, 1992). Further applications of ELISA to select seronegative broodfish have been later reported (Breuil & Romestand, 1999; Breuil *et al.*, 2000).

According to Watanabe *et al.* (2000) the detection of carrier barfin flounder (*Verasper moseri*) should be performed by simultaneous application of both PCR and ELISA to detect viral genome from ovarian biopsies and specific antibodies activity in sera from fish previously exposed to the infection.

Immunofluorescence antibody test

The application of IFAT is suggested in the diagnostic manual OIE (2006), both as a confirmatory method for identifying viral strains replicating on cell cultures (figure 7), both as an identification method applied directly on brain sections of symptomatic animals. In the latter case, the method allows a rapid confirmation of clinical suspicions, as long as only samples showing apparent clinical symptoms are processed, since the analytical sensitivity of the method is lower than molecular and isolation methods; nevertheless, during the clinical phase, the enormous amount of virus present in the brain tissue can easily permit a definitive diagnosis also by IF. In this regard a rapid method applied to brain imprints (figure 8) has been reported (Bovo *et al.*, 1999b). Furthermore the IF has also been widely applied as a method of studying the pathogenesis of the disease after experimental infection (Nguyen *et al.*, 1996; 1997; Tanaka *et al.*, 1998).

Polymerase Chain Reaction

Despite the fact that cell culture virus isolation represents the official method suggested by the OIE as the gold screening method for the detection of living infectious virus, molecular biology methods based primarily on the PCR test may offer a valid diagnostic method and an indispensable research tool. Thanks to their high sensitivity and specificity, molecular methods can detect the presence of viral genetic material in subjects with latent infection and in samples with very low virus concentrations (Iwamoto *et al.*, 2001a; 2001b). Most PCR methods have been developed primarily for the amplification of a small region of the genomic sequence of the RNA2 that codes for the virus's capsid protein (Nishizawa *et al.*, 1994; 1996; Thiery *et al.*, 1999b; Dalla Valle *et al.*, 2000; Grotmol *et al.*, 2000; Skliris *et al.*, 2001). In addition several studies have been focused on molecular biology analysis and

sequencing of RNA1 (Nagai & Nishizawa, 1999; Tan *et al.*, 2001; Sommerset & Nerland, 2004). In recent years, additional molecular procedures have been developed in order to improve sensitivity and specificity, such as real-time PCR (Starkey *et al.*, 2004; Dalla Valle *et al.*, 2005; Grove *et al.*, 2005, Ciulli *et al.*, 2006a).

CONTROL METHODS

The scarcity of epidemiological data and the limited knowledge on the pathogenic mechanisms of the disease still pose one of the greatest obstacles to the efficient control of VER. For this reason, a multifaceted approach must be adopted that combines the adoption of strict hygienic measures and direct prophylaxis actions and control over each and every broodfish with the identification and discharge of carriers that must necessarily be excluded from reproductive activity. Particular attention should be directed to the introduction of wild animals, potential vehicles of infection. When introducing new animals in a farm they must be segregated in quarantine areas until all the appropriate control tests have been completed prior to release into the broodstock. To this end, molecular methods characterized by high sensitivity and capable of identifying the presence of the viral genome in the gonads, seminal fluid and blood of carrier fish have been developed and described in recent years.

The development of molecular procedures based on nested and real-time PCR methods (Dalla Valle *et al.*, 2000; Gomez *et al.*, 2004; Starkey *et al.*, 2004; Dalla Valle *et al.*, 2005; Grove *et al.*, 2005; Ciulli *et al.*, 2006a) has increased significantly the analytical sensitivity of the diagnostic tests in this way providing a valuable tool for VER control.

Their adoption in official survey programs could increase in the next future the efficacy of the preventive measures applied in order to avoid or reduce outbreaks due to vertical transmission from infected broodfish to their offspring. In addition to these direct diagnostic methods, the possibility to adopt indirect diagnosis through the quantification of specific antibodies has also been described (Arimoto *et al.*, 1992; Breuil & Romestand, 1999).

Parallely to the control of the broodstock, disease control must provide for the compartmentalisation of the different productive areas, adoption of strict bio-security procedures including disinfection of tanks, nets, boots, and all the other equipment used, with particular attention to the hatchery, representing the most critical and dangerous site in terms of virus spreading inside and into the surroundings.

Among the substances with the best virucidal effect, a large description has been provided for iodophors, which are fully effective even at low concentration (25-100 ppm) (Arimoto *et al.*, 1996; Frerichs *et al.*, 2000; Maltese & Bovo, 2001). Valid results can be obtained using hypochlorite solutions (Arimoto *et al.*, 1996; Frerichs *et al.*, 2000), while the use of formalin seems to be less efficacious (Frerichs *et al.*, 2000).

In addition to the normal hygiene measures that must be taken, a correct management of the personnel assigned to the different activities and of the visitors must also be adopted. Particular attention should be paid to the disinfection of embryonated eggs. To this end different papers have underlined the use of ozone (Arimoto *et al.*, 1996; Grotmol & Totland, 2000). The application of ozone for disinfection of eggs hatched from halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) experimentally infected has been demonstrated to be particularly effective and capable of completely neutralising the virus adhering to the surface, in this way reducing the risk of transmitting the disease to the larvae (Grotmol & Totland, 2000). Nevertheless this procedure has not always proven effective, at least in regard to halibut infection (Johansen & Grotmol, personal communication). Similar discrepancies have also been reported with eggs of *Gadus morhua* and *Scophthalmus maximus*. According to Munday *et al.*, (2002) the water entering the hatcheries should be treated with ozone and no recirculation adopted. Treatment

of water entering the farm with UV radiation has also been proposed as a way to reduce environmental contamination (Arimoto *et al.*, 1996; Frerichs *et al.*, 2000; Maltese & Bovo, 2001).

It is amply clear, however, that like any other serious disease that cannot be chemically treated, VER control will undergo a significant improvement only when a valid vaccine will be available. In fact no commercial vaccine does yet exist, despite the increased efforts of certain research groups in the recent years (Husgarð *et al.*, 2001; Tanaka *et al.*, 2001; Yuasa *et al.*, 2002; Coeurdacier *et al.*, 2003; Sommerset *et al.*, 2003; 2005; Thiery *et al.*, 2006; Lin *et al.*, 2007) which in some cases have led to encouraging results.

The use of a recombinant capsid protein vaccine obtained from a viral strain of SJNNV has induced a significant level of protection in *Scophthalmus maximus* juveniles against a subsequent challenge with the homologous virus (Husgarð *et al.*, 2001). A similar result associated with the appearance of a significant antibody titer has been obtained in *Epinephelus septemfasciatus* (Tanaka *et al.*, 2001) following two consecutive intramuscular injections each consisting of 60 µg of recombinant capsid protein expressed in *Escherichia coli*. Partial protection has also been obtained in humpback grouper (*Chromileptes altivelis*) inoculated with three consecutive administrations at regular 10-day intervals of 70 µg of a mixture of three recombinant capsid proteins (Yuasa *et al.*, 2002). Sommerset *et al.*, (2001) described the efficacy of a recombinant SJNNV capsid protein vaccine in *Scophthalmus maximus* juveniles provided with intra-peritoneal inoculation. Subsequent studies confirmed the possibility of inducing significant protection in turbot (*Scophthalmus maximus*) using an AHNV recombinant capsid protein vaccine, whereas no protection at all was observed in subjects of the same species injected with a DNA-AHNV capsid protein vaccine (Sommerset *et al.*, 2005).

One final interesting observation worthy of further investigation is the degree of protection obtained in *Scophthalmus maximus* vaccinated with a DNA vaccine obtained through the insertion of the coding gene for the glycoprotein of hemorrhagic septicaemia virus (VHS) challenged with the nodavirus isolated from *Hippoglossus hippoglossus* (AHNV) (Sommerset *et al.*, 2003). The efficacy of a vaccine based on an RGNNV genotype strain inactivated by formalin and administered through intra-peritoneal inoculation in *Epinephelus septemfasciatus* has recently been reported (Yamashita *et al.*, 2005), and the high rate of survival (RPS=85) observed in subsequent field tests suggests the possibility for future practical application.

More recently, results obtained by Thiery *et al.* (2006), following injection i.m. of a recombinant baculovirus vaccine obtained from the expression of the capsid protein have shown, under experimental conditions, the possibility to induce a significant protection in seabass (*Dicentrarchus labrax*) of 22-66 grams against subsequent exposure to the virus.

FUTURE PROSPECTS

Despite having been already passed 20 years after the first description of the disease, some important issues still remain unresolved or not fully understood, particularly with regard to the mechanisms of disease transmission and the role of asymptomatic carriers.

For some species the possibility of vertical transmission has been strongly suggested; nevertheless it has not yet been definitively shown whether it is a true vertical transmission or, rather, a phenomenon of egg shell contamination is more likely to occur. If so, it would be just a matter of finding an effective disinfection protocol, which can prevent the transmission of the disease from infected broodfish to their offspring.

Otherwise, in the presence of a real *intra ovo* transmission, the only option to avoid infection in larval and juvenile stages will be based exclusively on the identification and removal of subclinical infected broodfish, besides the need for disinfection of water coming into the hatchery.

In this regard, as suggested by some authors, screening of broodfish could be advantageously implemented with the adoption of biomolecular diagnostic protocols for the research of the virus in ovarian and seminal fluids, and gonad biopsies and, simultaneously, serological methods, such as the ELISA, highlighting the presence of specific antibodies, a sign of previous infection.

More attention should also be addressed in future to interactions and exchanges of pathogens, between farmed and wild populations, to assess the risk of transmission of infection from one environment to another.

Despite all efforts that can be implemented and more restrictive measures taken, it is estimated that the optimal solution can be achieved only when an effective vaccine will be available.

AKNOWLEDGEMENTS

Many thanks are due to colleagues providing the electron microscopy (dr. Montesi Francesco), histopathology and immunohistochemistry (dr. Franco Mutinelli and dr. Marta Vascellari) pictures and to dr. Fabio Borghesan for his assiduous practical co-operation.

PLATE 1 – TAVOLA 1

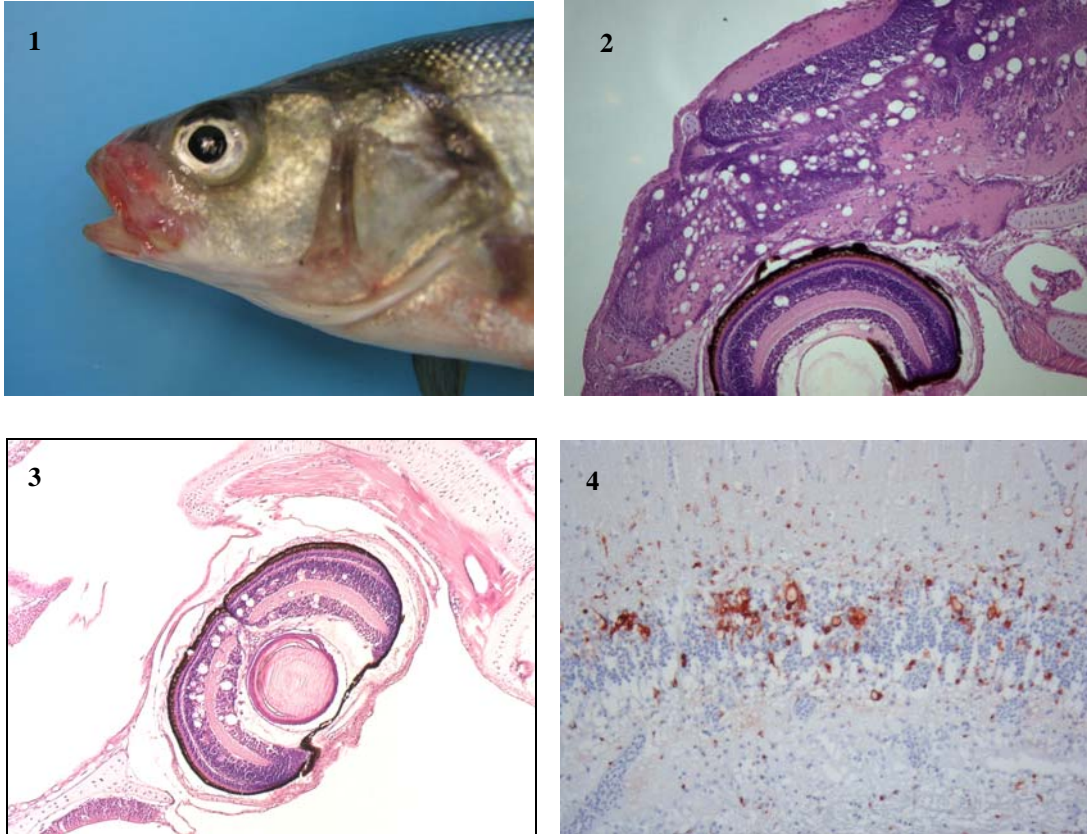


Figure 1 – European seabass (*Dicentrarchus labrax*) showing traumatic lesions associated to betanodavirus infection.

Figure 2 – European seabass larva (*Dicentrarchus labrax*) with vacuolar lesions scattered in the brain.

Figure 3 – European seabass larva (*Dicentrarchus labrax*) showing vacuolar lesions mostly scattered in the granular layers of the retina.

Figure 4 – Positive betanodavirus IHC staining on european seabass (*Dicentrarchus labrax*) brain section.

Figura 1 – Branzino (Dicentrarchus labrax) con lesioni traumatiche associate all'infezione da betanodavirus.

Figura 2 – Larva di branzino (Dicentrarchus labrax) con lesioni vacuoliformi distribuite in varie aree del cervello.

Figura 3 – Larva di branzino (Dicentrarchus labrax) con lesioni vacuoliformi diffuse prevalentemente negli strati granulari della retina.

Figura 4 – Immunoistochimica (IHC) positiva per betanodavirus su sezione di cervello di branzino (Dicentrarchus labrax).

PLATE 2 – TAVOLA 2

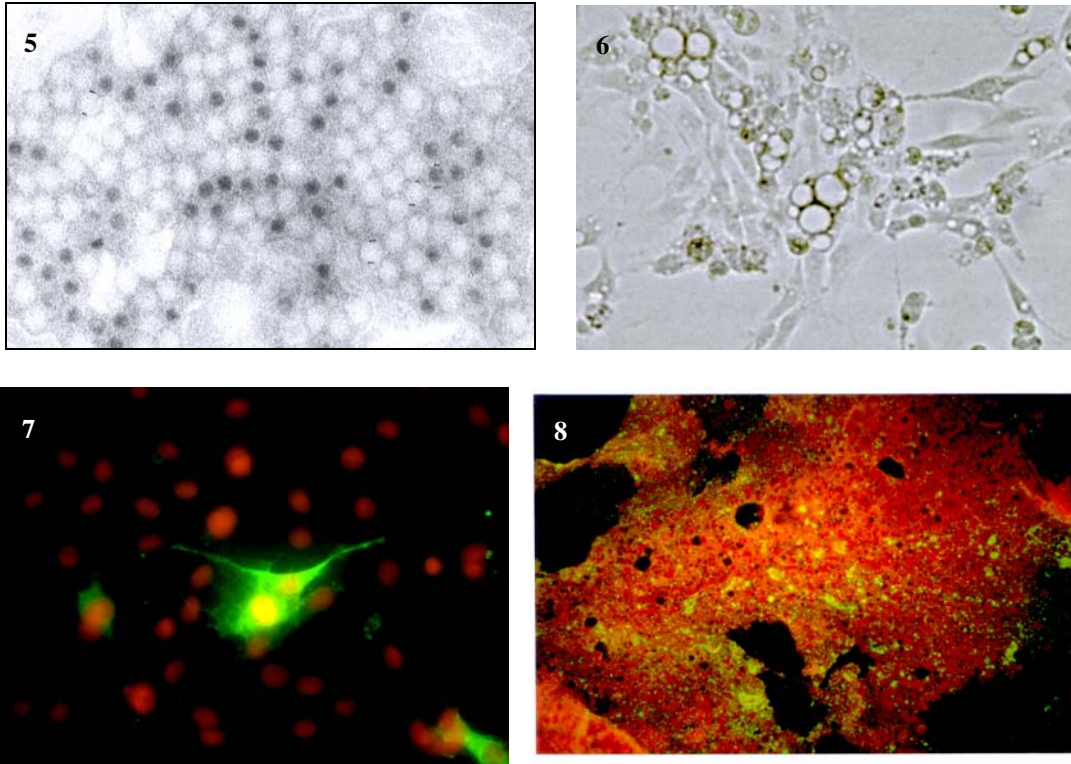


Figure 5 – Betanodavirus particles detected by EM in european seabass (*Dicentrarchus labrax*) brain.

Figure 6 – Betanodavirus cytopathic effect on SSN-1 cells.

Figure 7 – Positive betanodavirus IFAT staining on infected SSN-1 cells.

Figure 8 – Positive betanodavirus IFAT staining on european seabass (*Dicentrarchus labrax*) brain imprint.

*Figura 5 – Visione al Microscopio Elettronico di betanodavirus nel cervello di branzino (*Dicentrarchus labrax*).*

Figura 6 – Effetto citopatico causato da betanodavirus in cellule SSN-1.

Figura 7 – Immunofluorescenza (IF) positiva nei confronti di betanodavirus in cellule SSN-1.

*Figura 8 – IF positiva nei confronti di betanodavirus su impronta di cervello di branzino (*Dicentrarchus labrax*).*

Versione italiana

DENOMINAZIONE E CENNI STORICI

L'encefalopatia e retinopatia virale (ERV) (Munday *et al.*, 1992; OIE, 2006) nota anche con i sinonimi di encefalite del branzino (Bellance & Gallet de Saint-Aurin, 1988), necrosi nervosa virale (Yoshikoshi & Inoue, 1990), encefalomielite del rombo (Bloch *et al.*, 1991), encefalite ittica (Comps *et al.*, 1996), è una condizione neuropatologica, caratterizzata da vacuolizzazione e necrosi dei neuroni del sistema nervoso centrale (SNC) e delle cellule degli strati granulari della retina, descritta in diverse specie ittiche e sostenuta da alcuni agenti virali appartenenti alla famiglia *Nodaviridae*.

Il primo caso di ERV è stato descritto dettagliatamente nel 1988 da Bellance & Gallet de Saint-Aurin, in occasione di un grave episodio di mortalità, occorso nella Martinica francese, che aveva interessato stadi larvali e giovani soggetti di branzino europeo (*Dicentrarchus labrax*) d'allevamento. Già in precedenza comunque, Glazebrook & Campbell (1987), avevano descritto un episodio di mortalità verificatosi nel branzino australiano (*Lates calcarifer*) con presenza di lesioni cerebrali che, giudicando a posteriori, avrebbero potuto essere compatibili con un'infezione da betanodavirus.

Da allora questa patologia è stata evidenziata in oltre quaranta specie ittiche marine, allevate in diverse aree geografiche.

In accordo all'Office International des Epizooties (OIE, 2006) i vari episodi di mortalità, verificatisi in aree geografiche e specie diverse, caratterizzati da sintomatologia nervosa ed associati alla presenza di particelle virali appartenenti alla famiglia *Nodaviridae*, vanno ricondotti ad un'unica malattia denominata Encefalopatia e retinopatia virale (ERV), nota anche come necrosi nervosa virale (NNV), la quale può essere sostenuta da uno o più agenti virali, molto simili tra loro.

EZIOLOGIA

Caratteristiche morfologiche e genomiche

La ERV può essere causata da più agenti virali, preliminarmente identificati come membri della famiglia *Picornaviridae* (Glazebrook *et al.*, 1990; Bloch *et al.*, 1991; Breuil *et al.*, 1991), in grado di indurre, nei diversi ospiti colpiti, sintomi e lesioni comuni. Successivamente, in base alla caratterizzazione biochimica dell'acido nucleico e delle proteine strutturali ottenute da agenti isolati sia da larve di *Pseudocaranx dentex* (Mori *et al.*, 1992) che da cervello di *Dicentrarchus labrax* e *Lates calcarifer* (Comps *et al.*, 1994), i diversi agenti in grado di causare la ERV sono stati inclusi nella famiglia *Nodaviridae* (Schneemann *et al.*, 2005). Questa famiglia comprende due generi: gli *Alphanodavirus*, cui appartengono agenti patogeni per gli insetti, tra cui il Nodamura Virus (NOV), Blackbeetle Virus (BBV), Flock House Virus (FHV) e Boolarra Virus (BOV) (Schneemann & Marshall, 1998) ed il genere *Betanodavirus* che include alcune specie in grado di colpire i pesci (Carstens *et al.*, 2000; Schneemann *et al.*, 2005).

I virioni sono privi di envelope e possiedono un capsido a morfologia icosaedrica con diametro compreso tra 25 e 30 nm (Glazebrook *et al.*, 1990; Bloch *et al.*, 1991).

Il genoma consiste di due filamenti monoelica di mRNA-senso senza struttura poli-A. L'RNA1 (3,1 Kb) codifica per la proteina A (100 Kda), presumibilmente componente dell'RNA polimerasi RNA-dipendente, mentre l'RNA2 (1,4 Kb) codifica per la proteina capsidica (44×10^3 Da) (Mori *et al.*, 1992; Comps *et al.*, 1994). Oltre all'RNA1 e RNA2, una terza molecola di RNA (RNA3), già descritta negli alphanodavirus, sembra essere

sintetizzata dall'RNA1 nel corso della replicazione di SJNNV e rilevabile solo nel surnatante di cellule infette (Iwamoto *et al.*, 2001a; Sommerset & Nerland, 2004).

La maggior parte delle conoscenze della struttura e biologia molecolare dei nodavirus fa riferimento a studi riguardanti i virus isolati dagli insetti, i quali, pur rimanendo simili nell'organizzazione del genoma ed in alcune proprietà fisiche, differiscono dai betanodavirus, principalmente nella sequenza genomica del RNA e nella modalità di sintesi delle proteine capsidiche. Attraverso esperimenti di transfezione cellulare, infatti, è stato possibile dimostrare che la proteina capsidica dei betanodavirus ha un peso inferiore a quella degli alfanodavirus (37 Kda) e non è sottoposta al processo di proteolisi autocatalitico durante la maturazione dei provirioni in virioni infettanti, come avviene invece nel caso dei nodavirus degli insetti, ma è codificata direttamente da un segmento presente sull'RNA 2, chiamato ORF-1 (Delsert *et al.*, 1997a; 1997b).

Nella comparazione delle sequenze nucleotidiche ed aminoacidiche di RNA1 e RNA2 tra alfanodavirus e betanodavirus è stato rilevato un grado di omologia inferiore al 30% (Nishizawa *et al.*, 1995b; Nagai & Nishizawa, 1999).

L'omologia riscontrata all'interno dei betanodavirus invece, è molto elevata, sia a livello nucleotidico (>75%), sia a livello aminoacidico (80%) (Nishizawa *et al.*, 1995b). Questi risultati, in seguito confermati da Sideris *et al.* (1997) sottolineano l'elevata omologia esistente all'interno del genere betanodavirus che si differenzia significativamente dal genere alfanodavirus, con il quale esiste un grado limitato di omologia.

Dal punto di vista sierologico sono stati recentemente descritti 3 sierotipi: il sierotipo A trova corrispondenza col genotipo SJNNV, il sierotipo B si correla significativamente con il genotipo TPNNV, mentre il sierotipo C mostra correlazioni con i genotipi RGNNV e BFNNV. L'elevata correlazione sierologica evidenziata tra questi ultimi due genotipi, trova riscontro con l'elevata omologia della sequenza dell'RNA2, nei due genotipi stessi (Mori *et al.*, 2003).

Caratterizzazione tassonomica e filogenesi

I diversi ceppi di betanodavirus, fino ad oggi isolati, sono stati generalmente identificati con la sigla della specie di origine, seguiti dagli acronimi EV (encephalitis virus) o NNV (nervous necrosis virus) oppure NV (nodavirus).

In genere ogni specie è colpita da singoli agenti virali specie-specifici, ma sono stati descritti anche episodi in cui una specie ittica può essere infettata da ceppi virali diversi, come in *Dicentrarchus labrax* (Thiery *et al.*, 1999a).

In base all'analisi filogenetica della regione variabile T4 che codifica per la proteina capsidica del virus, i betanodavirus sono stati classificati in quattro genotipi distinti che coincidono con le specie virali fino ad oggi identificate (tabella 1): TPNNV, SJNNV, BFNNV e RGNNV, (Nishizawa *et al.*, 1995b; 1997; Dalla Valle *et al.*, 2001; Thiery *et al.*, 2004). I ceppi appartenenti ai genotipi SJNNV e TPNNV sono stati isolati rispettivamente dallo *Pseudocaranx dentex* e dal *Takifugu rubripes*. Il genotipo RGNNV, acronimo del nome inglese di red-spotted grouper (*Epinephelus akaara*), comprende ceppi isolati da un ampio numero di specie ittiche di acqua calda (Skiris *et al.*, 2001), mentre nel cluster BFNNV, il cui prototipo virale è stato isolato da *Verasper moseri*, si collocano i ceppi isolati da pesci di acqua fredda (Dannevig *et al.*, 2000; Grotmol *et al.*, 2000; Starkey *et al.*, 2001) con l'eccezione di un ceppo isolato dal rombo (TNV) di cui è stata proposta la classificazione in un quinto genotipo (Johansen *et al.*, 2004b).

Gli studi filogenetici evidenziano un punto di divergenza dei due generi TPNNV e SJNNV, dai restanti BFNNV-RGNNV che, considerato un tasso di evoluzione molecolare di $2,6 \times 10^{-3}$ sostituzioni nucleotidiche/sito/anno (Li *et al.*, 1988), può essere datato a circa 100-150 anni addietro. In ogni cluster inoltre sono state evidenziate divergenze minori riferibili agli ultimi

10 anni, probabilmente favorite dalle crescenti attività di acquacoltura che, nello stesso periodo, hanno subito un incremento notevole (Nishizawa *et al.*, 1997).

Specie nel Genere	Tentativo di Specie nel Genere
Barfin flounder nervous necrosis virus (BFNNV)	Atlantic cod nervous necrosis virus (ACNNV)
Red spotted grouper nervous necrosis virus (RGNNV)	Atlantic halibut nodavirus (AHNV)
Striped jack nervous necrosis virus (SJNNV)	Dicentrarchus labrax encephalitis virus (DIEV)
Tiger puffer nervous necrosis virus (TPNNV)	Dragon grouper nervous necrosis virus (DGNNV)
	Greasy grouper nervous necrosis virus (GGNNV)
	Grouper nervous necrosis virus (GNNV)
	Halibut nervous necrosis virus (HNNV)
	Japanese flounder nervous necrosis virus (JFNNV)
	Lates calcarifer encephalitis virus (LcEV)
	Malabaricus grouper nervous necrosis virus (MGNNV)
	Seabass nervous necrosis virus (SBNNV)
	Umbrina cirrosa nodavirus (UCNV)

Tabella 1 – Elenco delle specie appartenenti al genere *Betanodavirus* (Schneemann *et al.*, 2005).

I ceppi giapponesi appartenenti al genotipo RGNNV sono considerati progenie del ceppo originariamente isolato da *Paralichthys olivaceus*; questa ipotesi è avvalorata dall'ampia diffusione di questa specie ittica che, riprodotta artificialmente in numero significativo, viene distribuita, allo stadio giovanile, in diversi impianti di acquacoltura presenti su una vasta area geografica. Inoltre, considerato che un secondo ceppo isolato da questa specie appartiene al genotipo TPNNV, geneticamente lontano da RGNNV, si può ipotizzare che *Paralichthys olivaceus* possa aver giocato un ruolo fondamentale nella diffusione della ERV (Nishizawa *et al.*, 1997).

Con riferimento alla distribuzione geografica della malattia è stata ipotizzata, per i ceppi appartenenti ai genotipi BFNNV e RGNNV un'origine Europea ed una Pacifica per quanto riguarda i ceppi inclusi nei genotipi TPNNV e SJNNV (Aspehaugh *et al.*, 1999). Probabilmente, i ceppi appartenenti al genotipo SJNNV potrebbero essere giunti in Europa attraverso la commercializzazione di pesci ornamentali, adattandosi gradualmente alle specie autoctone sia d'acqua calda che d'acqua fredda. Si può ancora ipotizzare che gli stessi ceppi, dopo l'adattamento al nuovo ambiente e alle nuove specie, possano essere stati nuovamente trasferiti nel Pacifico, attraverso l'esportazione di varie specie ittiche (Aspehaugh *et al.*, 1999; Skliris *et al.*, 2001).

Inoltre si può ritenere che, molto ragionevolmente, l'evoluzione molecolare del virus possa essere stata significativamente influenzata dalla temperatura, con adattamento a specie ittiche tra loro diverse o anche identiche, diffuse in aree geografiche caratterizzate da temperature diverse (Totland *et al.*, 1999). Quest'ipotesi è supportata dall'individuazione di due ceppi virali, genotipicamente diversi tra loro, in grado, il primo di indurre la malattia in branzini allevati sulla costa atlantica ed il secondo di causare la malattia in soggetti appartenenti alla

stessa specie, ma allevata nel bacino del Mediterraneo, dove la temperatura è sensibilmente maggiore (Thiery *et al.*, 1999a). Inoltre, l'omologia genomica tra i ceppi virali isolati da specie dei mari orientali ed australiani con quella di virus isolati da pesci del Mediterraneo, suggerisce una via alternativa, ovvero la possibilità che si sia verificata un'evoluzione parallela/convergente, piuttosto che un continuo scambio di ceppi tra differenti aree geografiche (Dalla Valle *et al.*, 2001).

Un'ulteriore ipotesi relativa alla diffusione del virus, prende in considerazione l'utilizzo di alimento vivo, come *Artemia salina*, *Tigriopus japonicus* e *Acetesinte medius* (Chi *et al.*, 2003). Questi organismi infatti, potrebbero veicolare l'agente virale e diffondere facilmente la malattia in ampi territori; si giustificerebbe pertanto l'isolamento di ceppi simili in ospiti allevati in siti geografici lontani, come nel caso del ceppo isolato in Norvegia da halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) ed il ceppo isolato in Giappone da *Verasper moseri* (Grotmol *et al.*, 1995; Muroga, 1995).

Dalla Valle e coll. (2001) hanno ipotizzato, sulla base di uno studio filogenetico effettuato utilizzando nove ceppi virali dell'area Mediterranea, l'esistenza di un comune ceppo ancestrale ospite di *Dicentrarchus labrax*.

OSPITI E DISTRIBUZIONE GEOGRAFICA

Questa patologia, diffusa in diverse parti del mondo, rappresenta un importante problema economico per l'acquacoltura marina, soprattutto dove maggiore è il numero di specie allevate (Le Breton *et al.*, 1997; Munday & Nakai, 1997; Munday *et al.*, 2002). La malattia fino ad oggi è stata segnalata in oltre quaranta specie ittiche, prevalentemente di origine marina, appartenenti a diverse famiglie (tabella 2) e non si può escludere che in futuro, con l'intensificazione delle attività di acquacoltura, il numero delle specie sensibili possa aumentare significativamente, includendo anche specie oggi ritenute resistenti, quali l'orata (*Sparus aurata*), in cui recentemente si sono osservati preoccupanti episodi di mortalità (Beraldo *et al.*, 2007; Bovo *et al.*, osservazioni personali) e specie ornamentali (Gomez *et al.*, 2006).

La mortalità, che normalmente compare nel corso degli stadi larvali e giovanili, è spesso particolarmente grave.

La malattia è ampiamente diffusa nel sud-est Asiatico (Yoshikoshi & Inoue, 1990; Mori *et al.*, 1991; Nakai *et al.*, 1994; Nguyen *et al.*, 1994; Chua *et al.*, 1995; Danayadol *et al.*, 1995; Muroga, 1995; Fukuda *et al.*, 1996; Jung *et al.*, 1996; Chi *et al.*, 1997; Sohn & Park, 1998; Zafran *et al.*, 1998; Bondad-Reantaso *et al.*, 2000; Zafran *et al.*, 2000; Chi *et al.*, 2001; Lai *et al.*, 2001b; Oh *et al.*, 2002; Maeno *et al.*, 2002; Chi *et al.*, 2003; Hegde *et al.*, 2003); è ampiamente presente inoltre nel bacino del Mediterraneo (Breuil *et al.*, 1991; Bovo *et al.*, 1996; Sweetman *et al.*, 1996; Le Breton *et al.*, 1997; Pavoletti *et al.*, 1998; Thiery *et al.*, 1999a; Athanassopoulou *et al.*, 2003; 2004; Maltese *et al.*, 2005) ed è stata descritta anche nel Mare del Nord (Bloch *et al.*, 1991; Grotmol *et al.*, 1995). Più recentemente l'infezione da nodavirus è stata segnalata nelle acque costiere del Regno Unito (Starkey *et al.*, 2000; 2001), Israele (Ucko *et al.*, 2004), Nord America (Curtis *et al.*, 2001; Barker *et al.*, 2002; Gagnè *et al.*, 2004), Iran (Zorriehzahra *et al.*, 2005) ed India (Azad *et al.*, 2005).

Nonostante sia ritenuta tipica delle specie ittiche marine, la VER è stata riscontrata e descritta anche in alcune specie allevate in acqua dolce, quali anguilla europea (*Anguilla anguilla*) (Chi *et al.*, 2003), guppy (*Poecilia reticulata*) (Hedge *et al.*, 2003), *Parasilurus asotus* (Chi *et al.*, 2003), storione russo (*Acipenser gueldenstaedti*) (Athanassopoulou *et al.*, 2004), *Tandanus tandanus* e *Oxyeleotris lineolatus* (Munday *et al.*, 2002). La malattia è stata inoltre indotta sperimentalmente nella tilapia del Mozambico (*Oreochromis mossambicus*)

(Skliris & Richards, 1999b) e, più recentemente, in giovani ed adulti di medaka (*Oryzias latipes*) (Furusawa *et al.*, 2006) a conferma che la salinità non rappresenta un fattore condizionante. L'elevata omogeneità genetica riscontrata tra il ceppo isolato dalla specie marina *Epinephelus taurina* (ETNNV) e l'agente isolato da *Poecilia reticulata* (GNNV), specie dulciacquicola, suggerisce una possibile origine dell'infezione dall'ambiente marino (Hedge *et al.*, 2003).

Ordine	Specie ittiche	Areale geografico
Anguilliformes	<i>Anguilla anguilla</i>	Taiwan ¹
Gadiformes	<i>Gadus morhua</i>	Regno Unito ² , Canada ³ , USA ⁴ , Norvegia ⁵⁰
	<i>Melanogrammus aeglefinus</i>	Canada ⁵
Perciformes	<i>Lates calcarifer</i>	Australia ⁶ , Cina ⁷ , Indonesia ⁸ , Israele ^{7,13} , Malaysia ⁹ , Filippine ¹⁰ , Singapore ¹¹ , Tahiti ¹² , Taiwan ¹ , Thailandia ¹⁴ , India ¹⁵
	<i>Lateolabrax japonicus</i>	Giappone ¹⁶
	<i>Dicentrarchus labrax</i>	Caraibi ¹⁷ , Francia ¹⁸ , Grecia ¹⁹ , Italia ²⁰ , Malta ²¹ , Portogallo ²¹ , Spagna ²¹ , Israele ¹³
	<i>Epinephelus aeneus</i>	Israele ¹³
	<i>E. akaara</i>	Giappone ²² , Taiwan ²³
	<i>E. awoara</i>	Taiwan ²⁴
	<i>E. coioides</i>	Filippine ¹⁰ , Taiwan ¹
	<i>E. fuscoguttatus</i>	Taiwan ²⁴
	<i>E. malabaricus</i>	Thailandia ²⁶
	<i>E. marginatus</i>	Bacino del Mediterraneo ¹⁹
	<i>E. moara</i>	Giappone ²⁷
	<i>E. septemfasciatus</i>	Giappone ²⁸ , Corea ²⁹
	<i>E. tauvina</i>	Malaysia ³⁰ , Filippine ³⁰ , Singapore ³¹
	<i>Chromileptes altivelis</i>	Indonesia ³² , Taiwan ¹
	<i>Latris lineata</i>	Australia ⁷
	<i>Pseudocaranx dentex</i>	Giappone ³³
	<i>Seriola dumerili</i>	Giappone ³⁴
	<i>Trachinotus blochii</i>	Taiwan ¹
	<i>Trachinotus falcatus</i>	Taiwan ¹
	<i>Sparus aurata</i>	Francia ³⁵ , Italia ³⁶
	<i>Sciaenops ocellatus</i>	Corea ³⁷ , Israele ¹³
	<i>Umbrina cirrosa</i>	Italia ³⁸ , Francia ³⁹
	<i>Atractoscion nobilis</i>	Stati Uniti ⁴⁰
	<i>Oplegnathus fasciatus</i>	Giappone ⁴¹
	<i>Oplegnathus punctatus</i>	Giappone ³³
	<i>Oxyeleotris lineolata</i>	Australia ⁷
<i>Rachycentron canadum</i>	Taiwan ¹	
<i>Mugil cephalus</i>	Israele ¹³	
<i>Liza aurata</i>	Iran ⁴²	
<i>Lutjanus erythropterus</i>	Taiwan ¹	

Ordine	Specie ittiche	Areale geografico
Pleuronectiformes	<i>Verasper moseri</i>	Giappone ³⁴
	<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	Norvegia ⁴³ , Regno Unito ⁴⁴
	<i>Paralichthys olivaceus</i>	Giappone ⁴⁵
	<i>Scophthalmus maximus</i>	Norvegia ⁴⁶
	<i>Solea solea</i>	Regno Unito ²
Tetraodontiformes	<i>Takifugu rubripes</i>	Giappone ²⁷
Siluriformes	<i>Parasilurus asotus</i>	Taiwan ²⁵
	<i>Tandanus tandanus</i>	Australia ⁷
Cyprinodontiformes	<i>Poecilia reticulata</i>	Singapore ⁴⁷
Scorpaeniformes	<i>Sebastes oblongus</i>	Corea ⁴⁸
Acipenseriformes	<i>Acipenser gueldenstaedti</i>	Grecia ⁴⁹

Tabella 2 – Elenco delle specie in cui è stata evidenziata la malattia naturale e relative aree geografiche.

Bibliografia: (1) Chi *et al.*, 2001; (2) Starkey *et al.*, 2001; (3) Johnson *et al.*, 2001; (4) Johnson *et al.*, 2002; (5) Gagnè *et al.*, 2004; (6) Glazebrook & Campbell, 1987; (7) Munday *et al.*, 2002; (8) Zafran *et al.*, 1998; (9) Awang, 1987; (10) Maeno *et al.*, 2002; (11) Chang *et al.*, 1997; (12) Renault *et al.*, 1991; (13) Ucko *et al.*, 2004; (14) Glazebrook *et al.*, 1990; (15) Azad *et al.*, 2005; (16) Jung *et al.*, 1996; (17) Bellance & Gallet de Saint-Aurin, 1988; (18) Breuil *et al.*, 1991; (19) Le Breton *et al.*, 1997; (20) Bovo *et al.*, 1999a; (21) Skliris *et al.*, 2001; (22) Mori *et al.*, 1991; (23) Chi *et al.*, 1997; (24) Lai *et al.*, 2001b; (25) Chi *et al.*, 2003; (26) Danayadol *et al.*, 1995; (27) Nakai *et al.*, 1994; (28) Fukuda *et al.*, 1996; (29) Sohn & Park, 1998; (30) Bondad-Reantaso *et al.*, 2000; (31) Chua *et al.*, 1995; (32) Zafran *et al.*, 2000; (33) Mori *et al.*, 1992; (34) Muroga, 1995; (35) Comps & Raymond, 1996; (36) Dalla Valle *et al.*, 2000; (37) Oh *et al.*, 2002; (38) Pavoletti *et al.*, 1998; (39) Comps *et al.*, 1996; (40) Curtis *et al.*, 2001; (41) Yoshikoshi & Inoue, 1990; (42) Zorriehzakra *et al.*, 2005; (43) Grotmol *et al.*, 1995; (44) Starkey *et al.*, 2000; (45) Nguyen *et al.*, 1994; (46) Bloch *et al.*, 1991; (47) Hedge *et al.*, 2003; (48) Kim *et al.*, 2001; (49) Athanossopoulou *et al.*, 2004; (50) Pantel *et al.*, 2007.

Queste osservazioni sollevano alcuni interrogativi sulla possibilità che altre specie d'acqua dolce d'importanza commerciale, possano essere colpite dalla malattia se esposte accidentalmente all'agente causale.

Membri della famiglia Nodaviridae sono stati individuati oltre che nei pesci e negli insetti, anche in alcuni crostacei. Recenti segnalazioni da Taiwan, Cina ed isole dei Caraibi francesi, hanno confermato il coinvolgimento di un agente virale in gravi episodi di mortalità, riferiti come malattia della coda bianca, che hanno colpito alcuni allevamenti del gambero di acqua dolce *Macrobrachium rosenbergii* (Arcier *et al.*, 1999). Successivamente Widada e coll. (2003) hanno identificato l'agente isolato come membro della famiglia Nodaviridae. Indagini successive, condotte da Sudhakaran *et al.* (2006) infettando con lo stesso agente soggetti appartenenti alle specie *Penaeus indicus*, *Penaeus japonicus* and *Penaeus monodon*, non hanno dato alcun esito positivo, facendo quindi supporre una resistenza di queste specie nei confronti dell'agente isolato da *Macrobrachium rosenbergii*. Più recentemente Pantoja *et al.* (2007) hanno riportato l'identificazione di un agente provvisoriamente denominato LvNV (*Litopenaeus vannamei nodavirus*) da crostacei allevati in Belize.

L'elenco delle specie suscettibili o in cui è stata comunque evidenziata la presenza del virus, come ad esempio alcune specie commercializzate a scopo ornamentale (Gomez *et al.*, 2006), sembra essere in continua evoluzione.

SEGNI CLINICI ED ANATOMO-PATOLOGICI

Sintomatologia

I segni clinici della ERV sono conseguenti alle lesioni provocate nel SNC e nella retina e sono rappresentati principalmente da anomalie natatorie che si possono manifestare in vari modi, soprattutto in funzione dell'età e della specie ittica colpita. Nelle specie a simmetria bilaterale, i soggetti colpiti possono presentare un nuoto rettilineo e rapido in superficie, compiere ampi movimenti circolari, alternando lunghi periodi di atassia e nuoto letargico a rapidi guizzi. Alcuni soggetti assumono per brevi periodi posizioni stazionarie anomale, rimanendo in posizione verticale con l'estremità cefalica o con quella caudale fuori dalla superficie dell'acqua. Spesso si rinvengono soggetti che nuotano in superficie con un moto rettilineo talmente rapido da non riuscire ad arrestarsi in prossimità delle pareti delle vasche, procurandosi lesioni traumatiche mandibolari.

I pesci piatti manifestano generalmente scarsa sintomatologia. I soggetti colpiti possono rimanere a lungo adagiati sul fondo, evidenziando flessioni dorsali del corpo con testa e coda innalzate. In alcuni casi compaiono anche tremori coincidenti con l'inizio dell'attività natatoria, spesso molto breve, cui segue la caduta del soggetto sul fondo della vasca, con un movimento ondeggiante che ricorda "il distacco e la discesa delle foglie da un albero" (Perić, osservazioni personali).

In alcuni soggetti si nota una diminuzione dell'appetito ed un cambiamento progressivo della pigmentazione. Le larve di *Lates calcarifer* e di *Hippoglossus hippoglossus* tendono ad impallidire, mentre i giovani di *Hippoglossus hippoglossus*, *Dicentrarchus labrax*, *Scophthalmus maximus* ed *Epinephelus* spp., tendono ad assumere una colorazione più intensa, a partire dalla regione caudale (Bellance & Gallet de Saint-Aurin, 1988; Glazebrook *et al.*, 1990; Yoshikoshi & Inoue, 1990; Bloch *et al.*, 1991; Breuil *et al.*, 1991; Mori *et al.*, 1991; 1992; Boonyaratpalin *et al.*, 1996; Grotmol *et al.*, 1997b; Munday *et al.*, 2002).

L'età in cui più frequentemente si osserva la comparsa di sintomi e mortalità, è correlata alle modalità di infezione e alla specie colpita (Munday & Nakai, 1997). Le mortalità maggiori sono state osservate più frequentemente negli stadi larvali e in soggetti giovani, ma si possono verificare perdite significative anche in pesci adulti come in *Pseudocaranx dentex* (Arimoto *et al.*, 1993; Mushiake *et al.*, 1994; Nguyen *et al.*, 1997), *Epinephelus septemfasciatus* (Fukuda *et al.*, 1996; Tanaka *et al.*, 1998) e *Dicentrarchus labrax* (Bovo *et al.*, 1996; Le Breton *et al.*, 1997). Anche nel caso dell'halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) e di *Gadus morhua* allevati in Norvegia, di cui sono colpiti generalmente gli stadi larvali e giovanili (Grotmol, 2000; Johnson *et al.*, 2001), sono stati riportati casi di infezione in soggetti adulti (Aspehaug *et al.*, 1999; Pantel *et al.*, 2007).

La comparsa dei segni clinici può essere significativamente influenzata dalla temperatura (Arimoto *et al.*, 1994; Fukuda *et al.*, 1996; Tanaka *et al.*, 1998). Le prime osservazioni della malattia hanno evidenziato una stretta correlazione tra intensità dei segni clinici e delle lesioni istologiche a valori di temperatura dell'acqua superiori a 29-30°C, tipici del periodo estivo di aree tropicali: pertanto la patologia fu inizialmente chiamata "summer disease" (Bellance & Gallet de Saint Aurin, 1988).

Successivamente è stato osservato che l'infezione naturale può manifestarsi, in funzione delle specie colpite, entro un ampio range di temperatura, compreso tra 17 e 28°C.

La maggior parte dei pesci colpiti appartiene a specie d'acqua calda come *Epinephelus malabaricus*, in cui la mortalità si manifesta con valori di temperatura tra 28-30°C (Danayadol *et al.*, 1995), oppure le larve di *Pseudocaranx dentex* che manifestano i segni tipici della malattia in un intervallo di temperatura compreso tra 20-26°C (Arimoto *et al.*, 1994).

Secondo Fukuda *et al.* (1996) l'innalzamento della temperatura rappresenta un fattore predisponente la malattia, ovviamente con riferimento alle specie d'acqua calda. L'infezione è stata comunque riscontrata anche in specie d'acqua fredda, come nel caso di *Hippoglossus hippoglossus* (Grotmol *et al.*, 1995) e *Verasper moseri*, che manifestano la malattia a temperature comprese tra 4-5°C.

Tanaka *et al.* (1998) hanno concluso che, dopo inoculazione intramuscolare con omogenato di cervello e occhio prelevati da soggetti infetti in *Epinephelus septemfasciatus* ed in *Epinephelus akaara*, la mortalità ed i sintomi dell'infezione sono fortemente influenzati dalla temperatura dell'acqua; infatti la maggiore mortalità ed il minor periodo d'incubazione sono stati osservati a 28°C.

Nel branzino europeo (*Dicentrarchus labrax*) la manifestazione clinica dell'infezione compare in misura eclatante, a temperature superiori ai 23-25°C e tende a regredire non appena la temperatura scende intorno ai 18-22°C (Sweetman *et al.*, 1996; Bovo *et al.*, 1999a); più raramente si possono verificare focolai di malattia a temperature più basse, comprese tra 14-15°C, con sintomatologia scarsa o inapparente (Galeotti *et al.*, 1999; Borghesan *et al.*, 2003). Simili osservazioni sono state riportate anche nel caso di *Epinephelus septemfasciatus* (Tanaka *et al.*, 1998).

Inoltre, la malattia può assumere un andamento particolarmente grave in presenza di fluttuazioni giornaliere della temperatura dell'acqua, in grado di influenzare negativamente i meccanismi di difesa nei confronti del virus (Fukuda, dati non pubblicati).

Totland *et al.* (1999), hanno dimostrato che un ceppo giapponese virulento nei confronti di larve di *Pseudocaranx dentex*, una specie ittica che predilige alte temperature, non è in grado di replicarsi in larve di halibut, una specie di acqua fredda. Per contro, quest'ultima specie può essere infettata da un ceppo isolato in Norvegia, il quale però non è in grado di replicarsi in larve di *Pseudocaranx dentex*.

Lesioni anatomopatologiche

Tra le lesioni interne, è stata frequentemente riscontrata l'iperdilatazione della vescica natatoria, come in *Dicentrarchus labrax*, *Lates calcarifer* e *Pseudocaranx dentex* (Breuil *et al.*, 1991; Munday *et al.*, 2002). Talvolta sono state riscontrate aree depigmentate della cute a livello craniale, in corrispondenza del cervello, opercoli dilatati, lesioni mandibolari e arrossamento dell'area cefalica (Bovo *et al.*, 1996; Sweetmann *et al.*, 1996; Le Breton *et al.*, 1997; Pavoletti *et al.*, 1998), di probabile origine traumatica (figura 1). Non vengono segnalate altre lesioni significative durante episodi naturali della malattia.

Lesioni istopatologiche

All'esame istologico si apprezza la presenza di lesioni vacuolari in differenti regioni del cervello (mesencefalo, metencefalo, telencefalo, midollo allungato e corda spinale) tali da conferire un caratteristico aspetto spugnoso (figura 2). Inoltre sono state spesso descritte lesioni alla retina, associate o meno alla presenza di antigene virale caratterizzate dalla presenza di vacuoli localizzati negli strati granulari (figura 3), negli strati dei coni e bastoncelli ed in prossimità dell'epitelio germinativo (Munday *et al.*, 1992; Grotmol *et al.*, 1995; Comps & Raymond, 1996; Grove *et al.*, 2003). Oltre alle lesioni vacuolari, tipiche dell'azione dei betanodavirus, Grotmol *et al.* (1997b) hanno identificato, in un episodio di malattia naturale in *Hippoglossus hippoglossus*, la presenza di lesioni cardiache conseguenti, secondo gli stessi autori, alla fase viremica dell'infezione.

La numerosità e la grandezza dei vacuoli possono variare considerevolmente in funzione della specie colpita e soprattutto dell'età; i casi più gravi sono osservati negli stadi larvali e giovanili con presenza di vacuolizzazione estesa su vaste aree del sistema nervoso centrale e

dell'occhio (Glazebrook *et al.*, 1990; Breuil *et al.*, 1991). I nuclei e gli organelli delle cellule vacuolizzate si presentano spesso in uno stato avanzato di degenerazione.

In generale i vacuoli, sia intra che extracellulari, sono più numerosi nel mesencefalo e nello strato profondo della retina, anche se un forte interessamento si può osservare a carico del midollo spinale, soprattutto nella porzione sovrastante la vescica natatoria (Galeotti *et al.*, 1999). Grotmol e coll. (1997b) hanno evidenziato, in larve e giovani di *Hippoglossus hippoglossus*, la presenza di vacuolizzazioni, sia dei neuroni sia dei gangli cefalici in misura maggiore, sia nel "tectum optico" che nel sistema nervoso simpatico e gangli spinali. Al contrario secondo Le Breton *et al.* (1997), nei branzini adulti, il "tectum optico" rappresenterebbe la parte del sistema nervoso meno colpito. Lesioni evidenti sono state osservate anche nei gangli spinali di *Oplegnathus fasciatus* (Yoshikoshi & Inoue, 1990). Altre lesioni riportate includono picnosi e basofilia cellulare (Yoshikoshi & Inoue, 1990), picnosi focale, carioressi dei neuroni e presenza di cellule mononucleari infiltrate (Grotmol *et al.*, 1995). Inclusioni intracitoplasmatiche basofile sono state evidenziate in cellule neuronali di *Lates calcarifer*, *Dicentrarchus labrax* ed *Epinephelus malabaricus* (Glazebrook *et al.*, 1990; Breuil *et al.*, 1991; Boonyaratpalin *et al.*, 1996). Sono state descritte anche lesioni dei vasi sanguigni cerebrali (Le Breton *et al.*, 1997).

Nei branzini di età superiore all'anno, la malattia subisce una forte attenuazione della sintomatologia e delle lesioni istologiche (Galeotti *et al.*, 1999). In generale gli adulti presentano lesioni a carico del sistema nervoso centrale meno severe rispetto a quelle descritte negli stadi larvali e nei giovani, non essendo talvolta facile reperire i tipici fenomeni di vacuolizzazione a carico delle cellule nervose. Le vacuolizzazioni della retina invece, tendono ad essere più consistenti negli adulti. Il processo infiammatorio è generalmente molto discreto e la presenza di macrofagi è probabilmente secondaria alla vacuolizzazione.

Sono state riportate anche vacuolizzazioni nella mucosa dell'intestino posteriore, con formazione di gocce ialine e desquamazione epiteliale (Glazebrook *et al.*, 1990).

Altre alterazioni istologiche talvolta riscontrate in concomitanza di episodi di nodavirusi, a livello epatico, renale, cardiaco, intestinale e del muscolo scheletrico, non dovrebbero necessariamente essere ricondotte all'infezione da betanodavirus (Johansen *et al.*, 2004a).

Quadro subclinico

Risultano essere poche le notizie relativamente allo stato di portatore sano ed all'eliminazione del virus da parte di soggetti che hanno superato la malattia. Johansen *et al.* (2004a) hanno seguito l'evoluzione della malattia naturale in *Hippoglossus hippoglossus*, tramite immunostochimica e RT-PCR, evidenziando che nei sopravvissuti, è possibile identificare la presenza del virus, a livello del sistema nervoso centrale, per l'intero periodo di un anno di osservazioni; inoltre il reisolamento dell'agente su colture cellulari, a conclusione delle indagini, suggerisce che, almeno per quanto riguarda *Hippoglossus hippoglossus*, lo status di portatore possa essere particolarmente lungo. Sebbene i portatori asintomatici siano considerati come la principale fonte di trasmissione della malattia alle popolazioni suscettibili, i meccanismi che modulano la loro resistenza e regolano la replicazione virale, al loro interno, sono scarsamente documentati. L'identificazione del virus nelle gonadi sia maschili che femminili e nelle uova di riproduttori appartenenti a più specie (Arimoto *et al.*, 1992; Mushiake *et al.*, 1994; Nishizawa *et al.*, 1996; De Mas *et al.*, 1998; Dalla Valle *et al.*, 2000), ha suggerito l'esistenza di un probabile meccanismo di trasmissione verticale, con passaggio del virus dal riproduttore asintomatico alle larve, attraverso i prodotti sessuali. Anche Nguyen *et al.* (1997) hanno identificato, mediante immunofluorescenza, la presenza dell'antigene virale nelle gonadi, oltre che in altri organi quali intestino, stomaco, rene e fegato, mentre il SNC è risultato completamente negativo. In *Hippoglossus hippoglossus*, è stata evidenziata la presenza di particelle virali in neuroni,

astrociti, oligodendrociti, microglia, macrofagi, linfociti, endotelio vascolare, endotelio e mesotelio cardiaco ed epicardio (Grotmol *et al.*, 1997b). Particelle nodavirus-like sono state inoltre rinvenute nell'endocardio di salmoni (*Salmo salar*) affetti da sindrome miocardica (CMS) (Grotmol *et al.*, 1997a).

Dalla Valle e coll. (2000) hanno riscontrato, mediante RT-PCR, la presenza di nodavirus in soggetti asintomatici di *Sciaena umbra* e di *Sparus aurata*. In particolare quest'ultima specie è considerata, per la frequenza di positività riscontrata in laboratorio (Comps & Raymond, 1996; Dalla Valle *et al.*, 2000; Castric *et al.*, 2001) un potenziale quanto pericoloso ospite, che potrebbe fungere da portatore del virus negli allevamenti in cui è allevata la specie *Dicentrarchus labrax* che, nel Mediterraneo, rappresenta l'ospite target della ERV. Studi sperimentali hanno dimostrato che varie specie ittiche possono comportarsi come portatori asintomatici (Glazebrook, 1995; Skliris & Richards, 1999a; Johansen *et al.*, 2003).

Un ulteriore rischio cui sono esposte le popolazioni allevate è costituito dalla presenza, nella fauna selvatica, di specie suscettibili all'infezione che, pur non manifestando la malattia, sono in grado di mantenere l'infezione allo stato latente, consentendo la sopravvivenza del virus nell'ambiente e rappresentando pertanto una pericolosa fonte d'infezione.

In Canada alcune popolazioni di pesci selvatici sono sospettate di fungere da veri e propri serbatoi naturali virali: infatti, la presenza del virus è stata evidenziata, mediante RT-PCR, con una prevalenza dello 0,23%, nella specie *Pleuronectes americanus* (Barker *et al.*, 2002). Un successivo studio, condotto in Giappone su un campione rappresentativo di 30 specie ittiche prelevato nelle baie di Yashima (Prefettura di Kagawa) e Tamanoura (Prefettura di Nagasaki), ha confermato che la maggior parte della popolazione ittica, sia allevata che selvatica, pur non manifestando al momento della cattura alcun segno clinico, è risultata positiva (Gomez *et al.*, 2004). Le indagini condotte nel Mediterraneo hanno confermato la presenza dell'infezione in alcune specie selvatiche (Ciulli *et al.*, 2006b) con valori di prevalenza significativi che, nel caso della triglia (*Mullus barbatus barbatus*) ha raggiunto, in una indagine recentemente conclusa, valori pari al 28,8% (Maltese & Bovo, risultati non pubblicati).

E' evidente comunque che, nonostante le numerose osservazioni riportate in letteratura, sia fondamentale approfondire, nelle principali specie allevate, le conoscenze sui meccanismi di risposta all'infezione da nodavirus, al fine di migliorare le strategie di controllo della malattia.

TRASMISSIONE DELLA MALATTIA

Le molteplici osservazioni pratiche in campo, nonché i risultati delle prove sperimentali condotte da vari autori (Glazebrook *et al.*, 1990; Mori *et al.*, 1991; Arimoto *et al.*, 1993; Nguyen *et al.*, 1994; 1996; Thiery *et al.*, 1997; Grotmol *et al.*, 1999; Peducasse *et al.*, 1999; Totland *et al.*, 1999) concordano pienamente sulla modalità di trasmissione della malattia per via orizzontale; inoltre, per alcune specie, è stata proposta anche la possibilità di una trasmissione verticale (Nguyen *et al.*, 1997; Breuil *et al.*, 2002; Johansen *et al.*, 2002).

Tropismo tissutale

Sulla base delle lesioni istologiche, risulta evidente che i Betanodavirus possiedono un marcato neurotropismo primario con siti di moltiplicazione a livello del sistema nervoso centrale e della retina.

In letteratura sono riportati vari studi di patogenesi, eseguiti mediante infezione sperimentale in diversi stadi ed in differenti specie ittiche che hanno consentito di formulare varie ipotesi sulle modalità con cui il virus, a partire dalla penetrazione nell'ospite, raggiunge i siti di replicazione.

Secondo Nguyen *et al.* (1996), uno dei primi siti di moltiplicazione virale nelle larve di *Pseudocaranx dentex*, potrebbe essere rappresentato dalla corda spinale, che il virus raggiunge molto probabilmente, attraverso le terminazioni nervose sensoriali e motrici delle cellule nervose presenti a livello della linea laterale. Da qui il virus potrebbe raggiungere il cervello e da quest'ultimo, risalendo il nervo ottico, arrivare alla retina. In soggetti adulti, gli stessi autori hanno localizzato l'antigene virale mediante immunofluorescenza, nelle gonadi, intestino, stomaco, rene e fegato, ma non nel sistema nervoso centrale e nella retina, proponendo in tal modo una evidente differenza di distribuzione virale tra soggetti infetti e portatori sani. La positività riscontrata a livello viscerale suggerisce inoltre che uova e larve possano infettarsi al momento della deposizione e schiusa attraverso il virus eliminato con le feci e prodotti sessuali (Nguyen *et al.*, 1997).

L'individuazione della presenza virale nei lobi olfattivi suggerisce che, anche la cavità nasale possa rappresentare una possibile via d'ingresso (Mladineo, 2003).

Un'ulteriore ipotesi considera l'epitelio stratificato dell'intestino anteriore come possibile sito primario di replicazione. Questa regione infatti, viene facilmente a contatto con il virus presente nell'acqua o negli alimenti ingeriti. Da qui, attraverso le fibre viscerosensoriali e visceromotrici che connettono gli organi sensori ed effettori dei visceri con il sistema nervoso centrale, il virus potrebbe facilmente raggiungere il cervello e l'occhio (Munday *et al.*, 1992; Grotmol *et al.*, 1999).

Secondo Peducasse *et al.* (1999) le principali vie di penetrazione del virus potrebbero essere sia la cute, in corrispondenza della linea laterale, sia le branchie.

Trasmissione orizzontale

La modalità di trasmissione orizzontale è stata confermata attraverso numerosi studi sperimentali, utilizzando come modello stadi larvali o giovanili di soggetti appartenenti a differenti specie ittiche. In alcuni casi sono state verificate contemporaneamente le condizioni ambientali necessarie allo sviluppo della patologia, quali la temperatura e l'età del pesce.

La malattia è stata trasmessa per coabitazione di larve sane con larve infette, in *Lates calcarifer* (Glazebrook *et al.*, 1990). Giovani di *Epinephelus akaara*, in seguito ad infezione sperimentale per bagno e per inoculazione intraperitoneale con omogenato infetto, hanno sviluppato la malattia dopo 10-14 giorni dall'esposizione, con danni istopatologici simili a quelli causati nel corso di malattia naturale, ma con mortalità limitata al 10-30% (Mori *et al.*, 1991).

In *Pseudocaranx dentex* la malattia è stata riprodotta per bagno e coabitazione di larve sane con larve malate (Arimoto *et al.*, 1993; Nguyen *et al.*, 1996), con un tasso di mortalità del 100%; sempre con le stesse modalità d'infezione la ERV è stata trasmessa anche a giovani di *Paralichthys olivaceus* (Nguyen *et al.*, 1994).

In *Epinephelus malabaricus* la malattia è stata indotta tramite iniezione intraperitoneale di materiale infetto. I segni clinici erano sovrapponibili a quanto descritto per la malattia naturale e la mortalità indotta pari al 40-60%. In questa specie la patologia non ha mai

dimostrato un decorso acuto, sia in condizioni naturali che sperimentali, il quale invece può apparire in evidenti condizioni stressanti (Boonyaratpalin *et al.*, 1996).

Thiery e coll., nel 1997 hanno riportato una mortalità del 28% in giovani di *Dicentrarchus labrax* dopo inoculazione intramuscolare di omogenato di cervello infetto.

Nel 1999, Peducasse e coll., sempre in riferimento alla stessa specie ittica, hanno evidenziato che l'infezione orale, sia tramite bagno che attraverso coabitazione di pesci infetti con pesci sani, determina una forma sub-acuta, con lievi disturbi nervosi e bassa mortalità. Secondo gli stessi autori invece l'inoculazione intramuscolare di materiale infetto è in grado di indurre una forma acuta, caratterizzata da evidenti disturbi nervosi ed elevata mortalità. E' evidente pertanto che la dose infettante e la virulenza del ceppo, rappresentano fattori importanti nella patogenesi della malattia.

L'elevata resistenza dei betanodavirus alle condizioni ambientali (Frerichs *et al.*, 2000; Maltese & Bovo, 2001; Munday *et al.*, 2002) contribuisce senz'altro ad aumentare la probabilità della trasmissione orizzontale, soprattutto nelle aree endemiche; ciò si verifica in particolare quando i giovani, dalle avannotterie sono trasferiti negli impianti per il successivo svezzamento ed ingrasso.

Trasmissione verticale

Secondo alcuni autori la trasmissione verticale può rappresentare un'importante via di diffusione del virus tra le popolazioni allevate (Arimoto *et al.*, 1992; Yoshimizu *et al.*, 1997; Breuil *et al.*, 2002).

In realtà la trasmissione verticale se pur fortemente sospettata, sulla base di dati epidemiologici che indicano una predominanza dell'infezione nei primissimi stadi larvali e nei soggetti giovani di diverse specie allevate, in impianti alimentati da acqua preventivamente trattata (Breuil *et al.*, 1991; Arimoto *et al.*, 1992; Comps *et al.*, 1996; Yoshimizu *et al.*, 1997; Grotmol & Totland, 2000), non è stata ancora definitivamente dimostrata. La trasmissione verticale è stata proposta in seguito alla rilevazione dell'agente virale nelle gonadi e nelle uova fecondate di *Pseudocaranx dentex*, mediante ELISA (Arimoto *et al.*, 1992), RT-PCR (Mushiake *et al.*, 1994; Nishizawa *et al.*, 1996; Dalla Valle *et al.*, 2000; Breuil *et al.*, 2002) e IF (Nguyen *et al.*, 1996; 1997); inoltre il virus è stato identificato in uova e larve originate da riproduttori infettati sperimentalmente (Breuil *et al.*, 2002). Questi dati suggeriscono che la malattia si possa trasmettere da genitori a figli, anche se non è ancora chiaro se si tratti di una vera trasmissione intraovarica o se invece il virus sia un contaminante esterno in grado di trasmettere l'infezione alle giovani larve al momento della schiusa.

Altre vie di trasmissione

Nel 1998, Skliris & Richards hanno valutato la possibilità che *Artemia salina* ed il rotifero *Brachionus plicatilis*, alimenti freschi comunemente utilizzati negli impianti di acquacoltura marina per l'allevamento delle larve, potessero rappresentare serbatoi naturali di nodavirus e rivestire quindi un ruolo importante nella trasmissione della malattia. L'esito negativo delle indagini virologiche, eseguite infettando colture cellulari di SSN-1 con omogenati dei due invertebrati e l'assenza di particelle virali negli organi dei due invertebrati, hanno convinto gli autori che il rischio, in questo caso, sussista solo a livello di vettori meccanici, a seguito di contaminazione superficiale. Anche altri autori hanno considerato la possibilità che l'alimentazione a base di *Artemia salina*, *Tigriopus japonicus* e *Acetesinte medium*, da cui è stato possibile isolare il virus, possa costituire una fonte o veicolo d'infezione (Chi *et al.*, 2003).

Un'ulteriore possibilità di trasmissione della malattia può essere rappresentata dalla via orale tramite l'alimentazione con pesce fresco (Mori *et al.*, 2005), una pratica limitata ai soli riproduttori.

ASPETTI IMMUNITARI

Purtroppo gli studi e le informazioni riguardanti la risposta immunitaria dei pesci colpiti da ERV sono estremamente limitate. Spesso la malattia compare precocemente, in particolare nei primi stadi larvali. In questi casi la mortalità, costantemente elevata, è ragionevolmente riconducibile a carenze del sistema immunitario non ancora completamente efficiente. Nelle larve infatti, la sopravvivenza è affidata all'immunità materna e a meccanismi di immunità aspecifica propri o trasmessi dalla madre attraverso l'uovo. Nei soggetti sub-adulti invece, il sistema immunitario può ritenersi completamente sviluppato e, di conseguenza, essi riescono a rispondere in misura adeguata, neutralizzando gli effetti dannosi conseguenti all'infezione (Arimoto *et al.*, 1993; Mushiake *et al.*, 1994; Bovo *et al.*, 1996; Fukuda *et al.*, 1996; Le Breton *et al.*, 1997; Nguyen *et al.*, 1997; Tanaka *et al.*, 1998; Aspehaug *et al.*, 1999). I pesci che sopravvivono all'infezione possono rimanere portatori per un periodo relativamente lungo (Johansen *et al.*, 2004a). In essi, nonostante sia ancora presente una sintomatologia nervosa, non sempre viene riscontrata la presenza del virus e, nel caso in cui l'antigene sia rilevato, la concentrazione virale è molto bassa, tendendo a scomparire completamente dopo la guarigione (Fukuda *et al.*, 1996).

Studi preliminari riguardanti la risposta immunitaria di varie specie ittiche nei confronti dell'infezione sperimentale con betanodavirus o mediante l'uso di vaccini inattivati o ricombinanti, hanno consentito di identificare la comparsa di anticorpi specifici nei soggetti resistenti all'infezione (Breuil & Romestand 1999; Tanaka *et al.*, 2001; Yamashita *et al.*, 2005; Thiery *et al.*, 2006).

Studi sperimentali in halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) hanno evidenziato che la risposta anticorpale si manifesta solamente quando l'infezione sperimentale viene effettuata per inoculazione intraperitoneale e non tramite immersione (Grove *et al.*, 2003). Ciononostante, a seguito di un focolaio naturale è stato possibile seguire, tramite ELISA, la risposta anticorpale almeno fino ad un anno dall'infezione (Johansen *et al.*, 2004a).

I risultati osservati nel corso di una infezione sperimentale condotta su soggetti immunocompetenti di halibut, hanno evidenziato la comparsa di attività antivirale umorale a partire dal 18° giorno, con un chiaro aumento fino al 56° giorno post infezione. Ulteriori risultati ottenuti nel corso della stessa indagine suggeriscono che la presenza dell'antigene virale nel SNC è in grado di evocare una risposta immunitaria locale mediata da plasmacellule (Grove *et al.*, 2006).

METODI DIAGNOSTICI

La diagnosi di ERV è stata per molto tempo eseguita in base ai caratteristici segni clinici, associati alla presenza di lesioni vacuoliformi a livello del sistema nervoso centrale e della retina. In seguito l'individuazione di una linea cellulare (SSN-1) sensibile alla replicazione dei betanodavirus, ha consentito di disporre di un valido mezzo diagnostico (Frerichs *et al.*, 1996). Successivamente sono stati messi a punto ulteriori substrati cellulari utili ai fini diagnostici (Chi *et al.*, 1999a; Watanabe & Yoshimizu, 1999; Iwamoto *et al.*, 2000; Chang *et al.*, 2001; Lai *et al.*, 2001a; 2003) e, a partire dagli anni '90, sono stati applicati i primi test diagnostici biomolecolari.

In accordo all'Office International des Epizooties (OIE, 2006), lo screening dei soggetti asintomatici dovrebbe essere eseguito tramite isolamento dell'agente eziologico su colture cellulari SSN-1 o E-11, un clone derivato dalla linea SSN-1, seguito da identificazione virale mediante immunofluorescenza (IF) o PCR. Nel caso di sospetti clinici, oltre all'isolamento su colture cellulari e successivo riconoscimento, è possibile effettuare la diagnosi tramite identificazione diretta dai tessuti mediante IF, immunistochemica (IHC) o PCR.

Al di là di quanto previsto e raccomandato dal manuale OIE, in letteratura sono stati riportati vari metodi diagnostici e diverse applicazioni.

Esame istologico ed immunistochemico

L'analisi istologica e l'impiego di tecniche d'immunistochemica consentono di evidenziare la presenza dell'antigene virale nel citoplasma delle cellule degenerate e nelle lesioni di spongiosi, sia del SNC che della retina. Purtroppo, nel caso della ERV, l'esame istologico non può essere considerato un valido strumento diagnostico, in quanto sono stati descritti casi di malattia, in soggetti giovani, caratterizzati da scarsità o assenza di lesioni specifiche (Bovo *et al.*, 1996, Galeotti *et al.*, 1999) ed inoltre le lesioni vacuoliformi associate alla malattia, se pur molto indicative della stessa, non possono assolutamente essere considerate patognomiche. E' noto invece che l'immunistochemica rappresenta un metodo estremamente utile, sia ai fini diagnostici sia di ricerca (Mutinelli *et al.*, 1998; Grove *et al.*, 2003; Johansen *et al.*, 2004b). L'applicazione di questa metodica consente di associare, alle lesioni cellulari identificate nel SNC e nella retina, la presenza dell'agente causale e dei suoi antigeni (figura 4). L'immunistochemica inoltre può essere applicata per studi retrospettivi anche in assenza di sintomatologia e lesioni. Questa situazione è stata segnalata in avannotti di circa 3 grammi che, pur non presentando sintomatologia nervosa e lesioni istologiche classiche imputabili a nodaviriosi, sono risultati positivi all'analisi IHC (Galeotti *et al.*, 1999). La positività riscontrata mediante IHC in assenza di lesioni istologiche potrebbe indicare una limitata patogenicità del virus da cui un ridotto numero di cellule nervose coinvolte, tale da non determinare le tipiche vacuolizzazioni citoplasmatiche, oppure si potrebbe essere in presenza della fase di convalescenza ed in questo caso le rare cellule positive osservate rappresenterebbero la presenza residuale del virus in soggetti sopravvissuti alla malattia acuta (Galeotti *et al.*, 1999).

Nei casi caratterizzati da debole positività con rarissime cellule positive all'esame IHC del cervello è opportuno indagare a livello della retina, descritta come un sito di frequente reperimento dell'antigene virale (Galeotti *et al.*, 1999; Mladineo, 2003).

Microscopia elettronica

I Betanodavirus sono virus di ridotte dimensioni (25-30 nm) e pertanto la loro ricerca su materiale patologico al microscopio elettronico potrebbe risultare particolarmente difficoltosa, specie se presenti in concentrazione limitata. Nel corso di episodi conclamati, soprattutto se sono coinvolte fasi larvali e giovanili, la concentrazione di particelle virali è tale da non dover porre alcuna difficoltà diagnostica. All'osservazione su sezioni, i virioni si mostrano liberi nel citoplasma o legati alle membrane del reticolo endoplasmatico. Le membrane delle creste interne dei mitocondri si presentano completamente distrutte, mentre le membrane plasmatiche rimangono intatte. In alcuni casi le particelle virali sono state osservate in forma di aggregati paracristallini all'interno del citoplasma (figura 5) (Glazebrook *et al.*, 1990; Bloch *et al.*, 1991; Breuil *et al.*, 1991; Boonyaratpalin *et al.*, 1996; Grotmol *et al.*, 1997b).

Le cellule contenenti i virioni sono soprattutto neuroni, astrociti, oligodendrociti e cellule della microglia (Yoshikoshi & Inoue, 1990; Grotmol *et al.*, 1997b). Tuttavia nell'halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) sono state visualizzate particelle virali anche nelle cellule

endoteliali, in linfociti prossimi all'endocardio, nei miociti cardiaci e nelle cellule dell'epicardio (Grotmol *et al.*, 1997a).

Isolamento del virus mediante colture cellulari

Le colture cellulari rappresentano il più importante mezzo a disposizione per l'isolamento, la replicazione e l'identificazione dei virus animali. Fino al 1993 erano state stabilizzate, per l'isolamento e l'identificazione dei virus patogeni dei pesci, oltre 150 linee cellulari (Fryer & Lannan, 1994). La maggior parte di queste linee cellulari sono derivate da tessuti di pesci d'acqua dolce e solo una parte minore da pesci marini. In passato, subito dopo la comparsa della ERV, sono stati riportati numerosi tentativi d'isolamento del virus sulle principali linee cellulari esistenti (Watanabe & Yoshimizu, 1999), ma tutti con esito negativo. Nel 1996 Frerichs *et al.* sono riusciti a replicare il virus su una linea cellulare originata nel 1991, da avannotti di *Ophiocephalus striatus*, denominata SSN-1. Si tratta di una linea di non facile mantenimento, persistentemente infetta da un retrovirus di tipo C, denominato SnRV (Frerichs *et al.*, 1991; Hart *et al.*, 1996). Per ovviare all'utilizzo di questo substrato cellulare contaminato, sono stati creati sei cloni cellulari dalla stessa linea (A6, B7, C3, E2, E9, E11) e per ognuno di essi è stata valutata la suscettibilità nei confronti dei quattro genotipi di betanodavirus (Iwamoto *et al.*, 2000). Purtroppo i tre cloni risultati più permissivi allo sviluppo dell'effetto citopatico (A6, E9, E11) sono risultati ancora positivi (tramite PCR e TEM) alla presenza del SnRV. Questo dato suggerisce che il retrovirus contaminante, possa giocare un ruolo importante per la replicazione del virus nelle cellule SSN-1 e cloni derivati (Lee *et al.*, 2002), inducendo probabilmente la produzione di uno specifico recettore di membrana in grado di consentire l'adesione del nodavirus alle singole cellule. In effetti, nell'ambito di un progetto di ricerca specifico, colture cellulari apparentemente indenni da retrovirus, ottenute da gonadi, larve, pinne e cervello di branzino (*Dicentrarchus labrax*), si sono dimostrate completamente refrattarie all'azione di un ceppo di riferimento isolato da branzino (osservazioni personali degli autori).

In seguito comunque sono state sviluppate altre linee cellulari sensibili ai betanodavirus, quali le GF-1, derivate da tessuto di pinna di *Epinephelus coioides* (Chi *et al.*, 1999a; 1999b), le SF, derivate da larve di *Lates calcarifer* (Chang *et al.*, 2001), le GB, originate da cervello di *E. awoara* (Lai *et al.*, 2001b; 2003), le TF da *Scophthalmus maximus* (Aranguren *et al.*, 2002) e le GS, originate da milza di *E. coioides* (Qin *et al.*, 2006). Recentemente è stata allestita una linea cellulare denominata BB, originata da cervello di branzino australiano (*Lates calcarifer*), persistentemente infetta da virus della ERV. Questa linea potrà costituire un valido modello di studio, per comprendere il meccanismo d'infezione e replicazione virale sia *in vivo* che *in vitro* (Chi *et al.*, 2005).

Ulteriori informazioni sulla capacità dei nodavirus isolati da branzini, di propagarsi in colture cellulari, sono state ottenute studiando il ciclo litico in tre linee cellulari di pesce (SBL, RTG-2, BF-2) ed in una linea di mammifero (Cos1) (Delsert *et al.*, 1997b). Le cellule di pesce sono risultate più permissive rispetto a quelle di mammifero e ciò dimostra che i nodavirus dei pesci, a differenza di quelli degli insetti, non sono in grado di replicarsi in molte colture cellulari. Inoltre, mentre questi ultimi infettano una grande varietà di tessuti negli insetti malati, i betanodavirus possiedono un tropismo specifico per le cellule neuronali.

Nelle cellule SSN-1, l'effetto citopatico si manifesta a partire dal 3° giorno post-infezione ed è caratterizzato dalla comparsa di vacuoli intracellulari irregolarmente distribuiti nel monostrato. I vacuoli di forma sferica, appaiono inizialmente isolati e, col progredire delle ore, si presentano in forma di aggregati cellulari vacuolizzati (figura 6). A distanza di 72 ore dall'infezione il loro numero e le dimensioni aumentano notevolmente e il monostrato

cellulare regredisce gradualmente favorendo la comparsa di aree di completa distruzione e lisi cellulare.

Studi successivi hanno dimostrato che le cellule SSN-1 possono essere utili anche per differenziare tra loro genotipi caratterizzati da temperature ottimali di crescita diverse e che si sono adattati alle specie che prediligono simili temperature (Totland *et al.*, 1999).

Infatti uno studio basato sulle caratteristiche dell'effetto citopatico su SSN-1, ha consentito di identificare dall'esame degli effetti citopatici causati da 17 ceppi virali isolati da 13 specie ittiche marine, 4 diversi gruppi (Iwamoto *et al.*, 1999).

Il primo gruppo, comprendente 9 ceppi virali appartenenti al genotipo RGNNV ed isolati da *Epinephelus akaara*, *E. septemfasciatus*, *E. mooara*, *E. coioides*, *Dicentrarchus labrax*, *Lates calcarifer*, *Oplegnathus punctatus*, *Paralichthys olivaceus*, determina a distanza di tre giorni dall'infezione su SSN-1, un effetto citopatico caratterizzato da cellule rotonde, granulari con vacuoli citoplasmatici che portano alla distruzione completa del monostrato entro il 6° giorno.

Il secondo gruppo comprende ceppi appartenenti al genotipo SJNNV, isolati da *Pseudocaranx dentex*, che provocano un effetto citopatico caratterizzato da cellule piccole, rotonde, granulari e rifrangenti senza la comparsa di consistenti vacuolizzazioni.

Il terzo gruppo, rappresentato da un unico ceppo appartenente al genotipo TPNNV, isolato da *Takifugu rubripes* ed il quarto gruppo, rappresentato da ceppi appartenenti al genotipo BFNNV (4 isolati da *Paralichthys olivaceus*, 1 ceppo isolato da *Gadus macrocephalus* ed 1 ceppo da *Hippoglossus hippoglossus*) inducono la comparsa di un effetto citopatico simile a quello indotto dai ceppi del primo gruppo, ma solo alla temperatura di 20°C, diversamente dai ceppi del primo gruppo in grado di replicarsi a temperature di 25-30°C. Infatti, oltre alle differenze riscontrate a livello di effetto citopatico, i ceppi virali appartenenti ai 4 diversi genotipi evidenziano una temperatura di replicazione ottimale diversa fra i vari tipi: 15-20°C per BFNNV, 20°C per TPNNV, 20-25°C per SJNNV e 25-30°C per RGNNV (Iwamoto *et al.*, 2000).

Questi dati sono estremamente interessanti a scopo diagnostico, in quanto indicano la necessità di incubazione dei monostrati a diverse temperature se la situazione epidemiologica evidenzia, in una stessa area, la presenza di genogruppi diversi.

Metodiche immunoenzimatiche

In letteratura sono riportati diversi esempi di applicazione di metodologie immunoenzimatiche, come la metodica ELISA (Enzimed-Linked Immunosorbent Assay) che trova la sua più idonea applicazione come tecnica sierologia nella ricerca dell'attività anticorpale (Mushiaki *et al.*, 1992, Nishizawa *et al.*, 1995a; Breuil & Romestad, 1999; Breuil *et al.*, 2000; Watanabe *et al.*, 2000; Breuil *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 2001; Husgarö *et al.*, 2001, Lai *et al.*, 2001a; Grove *et al.*, 2003). Le limitazioni di questo test riguardano soprattutto la mancata correlazione spesso evidenziata tra la rilevazione di anticorpi specifici e la positività alla malattia. Infatti, pesci risultati positivi nei confronti del virus, possono risultare negativi al test anticorpale e viceversa (Husgarö *et al.*, 2001).

Comunque la tecnica ELISA risulta particolarmente utile per l'identificazione dei portatori sani presenti nel parco riproduttori, ai fini della loro eliminazione. Indagini condotte su biopsie gonadiche hanno infatti evidenziato un'elevata prevalenza dell'infezione in opposizione alla negatività riscontrata a livello del cervello (Arimoto *et al.*, 1992). Oltre all'identificazione del virus, tramite ricerca diretta nei tessuti, l'ELISA costituisce un metodo vantaggioso per l'evidenziazione dell'attività anticorpale conseguente ad una esposizione al virus (Breuil & Romestand, 1999; Breuil *et al.*, 2000).

Talvolta il solo esame sierologico potrebbe essere comunque insufficiente a stabilire lo status sanitario di un soggetto; infatti, secondo Watanabe *et al.* (2000) l'identificazione dei

portatori sani, nel parco riproduttori di *Verasper moseri*, richiederebbe l'uso contemporaneo della tecnica ELISA, per la ricerca di eventuale attività anticorpale, nonché della PCR, per la ricerca del virus da biopsie ovariche.

Immunofluorescenza

L'utilizzo della immunofluorescenza (IF) è suggerito nel manuale diagnostico OIE (2006), sia come metodica di conferma per l'identificazione virale a seguito di isolamento dell'agente causale su colture cellulari (figura 7), sia come metodica di identificazione, applicata direttamente su sezioni di cervello di animali sintomatici. L'utilizzo diagnostico, in questo secondo caso, consente una rapida conferma del sospetto clinico, purchè si tratti di malattia conclamata, in quanto la sensibilità del metodo è sicuramente inferiore a quella delle metodiche biomolecolari o di isolamento su colture cellulari; tuttavia in casi di sintomatologia eclatante, l'enorme quantità di virus presente nel tessuto cerebrale consente di ottenere facilmente una conferma diagnostica anche mediante l'IF. A questo proposito è stata riportata anche una metodica rapida applicata ad impronte di cervello (figura 8) (Bovo *et al.*, 1999b). L'IF inoltre è stata efficacemente utilizzata come metodica di studio della patogenesi della malattia a seguito di infezione sperimentale (Nguyen *et al.*, 1996; 1997; Tanaka *et al.*, 1998).

Polymerase Chain Reaction

Sebbene l'isolamento del virus in colture cellulari, rappresenti il metodo ufficiale suggerito dall'OIE, in grado di rilevare la capacità infettante del virus, le metodiche di biologia molecolare, basate prevalentemente sulla metodica di Polymerase Chain Reaction (PCR), rappresentano oggi un valido strumento diagnostico e un indispensabile metodo di ricerca. Grazie alla loro elevata sensibilità e specificità, le metodiche biomolecolari sono in grado di rilevare la presenza di materiale genetico virale da soggetti con infezione latente e comunque in campioni con bassa concentrazione di particelle virali (Iwamoto *et al.*, 2001a; 2001b), altrimenti non identificabili. La maggior parte delle metodiche di PCR sono state finalizzate soprattutto all'amplificazione di una parte della sequenza genomica dell'RNA2 codificante per la proteina capsidica del virus (Nishizawa *et al.*, 1994; 1996; Thiery *et al.*, 1999b; Dalla Valle *et al.*, 2000; Grotmol *et al.*, 2000; Skliris *et al.*, 2001), anche se non mancano studi sull'analisi biomolecolare e sequenziamento dell'RNA1 (Nagai & Nishizawa, 1999; Tan *et al.*, 2001; Sommerset & Nerland, 2004). Negli ultimi anni sono state sviluppate e validate altre procedure biomolecolari al fine di aumentare la sensibilità e la specificità, quali real-time PCR per la quantificazione assoluta dell'RNA di betanodavirus (Starkey *et al.*, 2004; Dalla Valle *et al.*, 2005; Grove *et al.*, 2005; Ciulli *et al.*, 2006a).

METODI DI CONTROLLO

La scarsità di dati epidemiologici nonché la carente conoscenza dei meccanismi patogenetici della malattia, costituiscono ancor oggi uno dei maggiori ostacoli per un'efficace controllo della ERV, già difficile di per sé per la tipologia dell'ambiente di allevamento. Si rende pertanto necessario procedere con un approccio multivalente che affianchi all'adozione di rigide misure igienico-sanitarie, comprensive di azioni di profilassi diretta, il controllo di ogni singolo riproduttore con l'eliminazione dei soggetti portatori asintomatici che, necessariamente, devono essere esclusi da ogni attività riproduttiva. Particolare attenzione va indirizzata all'introduzione di animali selvatici, potenziali veicoli d'infezione; essi andranno segregati in aree di quarantena per gli opportuni controlli, prima di essere introdotti nei cicli produttivi assieme agli altri riproduttori. A questo scopo, negli

ultimi anni sono stati sviluppati e descritti metodi biomolecolari, scarsamente invasivi, in grado di identificare la presenza del genoma virale nelle gonadi, liquido seminale e sangue dei riproduttori infetti, evitandone il sacrificio.

Lo sviluppo di procedure biomolecolari basate sull'utilizzo della nested PCR ha consentito di elevare significativamente la sensibilità analitica rispetto alla RT-PCR tradizionale, fornendo un efficace strumento per il controllo della ERV (Dalla Valle *et al.*, 2000; Gomez *et al.*, 2004; Starkey *et al.*, 2004; Dalla Valle *et al.*, 2005; Grove *et al.*, 2005; Ciulli *et al.*, 2006a).

Più recentemente sono state descritte alcune metodiche di real-time PCR caratterizzate da elevata sensibilità analitica ed in grado di consentire un'accurata quantificazione del virus nei tessuti infetti (Starkey *et al.*, 2004; Dalla Valle *et al.*, 2005; Grove *et al.*, 2005). Il loro trasferimento all'attività diagnostica per il controllo delle aziende potrà aumentare l'efficacia di screening dei riproduttori al fine di prevenire o, quanto meno ridurre, i casi di trasmissione verticale dell'infezione virale alla progenie. Oltre alla diagnosi diretta, con evidenziazione dell'antigene virale o del suo genoma, è stata descritta anche la possibilità di ricorrere alla diagnosi indiretta tramite quantificazione degli anticorpi specifici (Arimoto *et al.*, 1992; Breuil & Romestand, 1999).

Parallelamente all'azione di controllo dei riproduttori, la gestione della malattia deve prevedere la compartimentalizzazione dei vari reparti produttivi con adozione di rigide misure di biosicurezza e disinfezione di vasche, reti, stivali e tutti gli attrezzi impiegati, con particolare riferimento all'avannotteria, che rappresenta il sito maggiormente sensibile ed anche il più pericoloso al fine della diffusione del virus nell'ambiente.

Tra le sostanze a maggior effetto virucida sono stati descritti gli iodofori, attivi anche a bassa concentrazione (25-100 ppm) (Arimoto *et al.*, 1996; Frerichs *et al.*, 2000; Maltese & Bovo, 2001). Risultati altrettanto validi possono essere ottenuti utilizzando soluzioni di ipoclorito (Arimoto *et al.*, 1996; Frerichs *et al.*, 2000), mentre l'impiego della formalina rivela una minor efficacia (Frerichs *et al.*, 2000).

Oltre alle normali procedure igieniche che devono prevedere anche una corretta gestione del personale addetto alle diverse attività lavorative e degli eventuali visitatori, particolare attenzione dovrebbe essere riservata alla disinfezione delle uova embrionate. A tale scopo diversi autori hanno suggerito l'uso dell'ozono (Arimoto *et al.*, 1996; Grotmol & Totland, 2000). Il trattamento con ozono delle uova ottenute da *Hippoglossus hippoglossus* infettati sperimentalmente, si è dimostrato pienamente efficace ed in grado di inattivare completamente il virus adeso sulla superficie, riducendo così il rischio di trasmissione della malattia alle larve (Grotmol & Totland, 2000). Ciononostante, la procedura non si è rivelata sempre efficace, almeno per quanto riguarda l'infezione dell'halibut (Johansen & Grotmol, comunicazione personale). Scostamenti simili sono stati riportati anche nei confronti delle uova di *Gadus morhua* e *Scophthalmus maximus*. Secondo Munday *et al.* (2002) l'acqua in entrata in azienda dovrebbe essere miscelata con ozono ed utilizzata una sola volta.

Al fine di ridurre la contaminazione ambientale è stato proposto il trattamento mediante UV dell'acqua in entrata in allevamento (Arimoto *et al.*, 1996; Frerichs *et al.*, 2000; Maltese & Bovo, 2001).

E' indubbio comunque che il controllo della VER, come di altre gravi patologie non trattabili con chemioterapici, potrà subire una svolta importante e decisiva solo con l'impiego di un valido vaccino. Non esiste infatti a tutt'oggi alcun vaccino commerciale, malgrado sia aumentata negli ultimi anni l'attenzione di diversi gruppi di ricerca (Husgarð *et al.*, 2001; Tanaka *et al.*, 2001; Yuasa *et al.*, 2002; Coeurdacier *et al.*, 2003; Sommerset *et al.*, 2003; 2005; Thiery *et al.*, 2006; Lin *et al.*, 2007) che, in qualche caso, ha portato a risultati incoraggianti.

L'impiego di un vaccino adiuvato ricombinante, ottenuto da un ceppo virale di SJNNV, ha consentito di indurre in soggetti giovani di *Scophthalmus maximus*, un livello di protezione significativo nei confronti di una successiva esposizione al virus omologo (Husgarö *et al.*, 2001). Analogo risultato, associato alla comparsa di un elevato titolo anticorpale, è stato ottenuto dopo due somministrazioni intramuscolari ripetute a distanza di dieci giorni l'una dall'altra, di 60 µg di proteina capsidica ricombinante espressa in *Escherichia coli* in soggetti di *Epinephelus septemfasciatus* (Tanaka *et al.*, 2001). Una parziale protezione è stata ottenuta anche in *Chromileptes altivelis* inoculati con tre successive somministrazioni di 70 µg di una miscela di tre proteine capsidiche ricombinanti, ad intervalli regolari di 10 giorni (Yuasa *et al.*, 2002). Sommerset *et al.* (2001) hanno descritto l'efficacia di un vaccino ricombinante, allestito con la proteina capsidica di SJNNV, in giovani rombi (*Scophthalmus maximus*) inoculati intraperitonealmente. Con successive indagini è stata confermata la possibilità di indurre una protezione significativa in rombi vaccinati con la proteina capsidica ricombinante di AHNV, mentre non è stata evidenziata alcuna protezione in soggetti appartenenti alla stessa specie, inoculati con un vaccino a DNA codificante per la proteina capsidica di AHNV (Sommerset *et al.*, 2005).

Un dato interessante che merita di essere approfondito, riguarda la protezione ottenuta in *Scophthalmus maximus* vaccinati con un vaccino a DNA ottenuto con inserimento del gene codificante la glicoproteina del virus della setticemia emorragica virale (VHS) sottoposti a challenge con il nodavirus isolato da halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) (AHNV) (Sommerset *et al.*, 2003). Recentemente è stata riportata l'efficacia di un vaccino, basato su un ceppo appartenente al genotipo RGNNV inattivato con formalina e somministrato per via intraperitoneale in *Epinephelus septemfasciatus* (Yamashita *et al.*, 2005). L'elevato indice di sopravvivenza (RPS=85) osservato in successive prove di campo, suggerisce la possibilità di una possibile applicazione pratica.

Più recentemente, indagini eseguite da Thiery *et al.* (2006) mediante la somministrazione intramuscolare di un vaccino ricombinante, ottenuto dall'espressione della proteina capsidica in baculovirus, hanno evidenziato la possibilità di ottenere una protezione significativa in branzini (*Dicentrarchus labrax*) di 22-66 grammi, nei confronti di una successiva esposizione al virus in condizioni sperimentali.

PROSPETTIVE FUTURE

Malgrado siano trascorsi oltre venti anni dalle prime segnalazioni della malattia, restano tuttora irrisolti o da chiarire completamente alcuni importanti aspetti riguardanti soprattutto l'epidemiologia della malattia e, in particolare i meccanismi di trasmissione della stessa e il ruolo dei portatori asintomatici.

Per alcune specie è stata fortemente ipotizzata la possibilità di una trasmissione verticale; ciononostante non è stato ancora definitivamente dimostrato se si tratti di una trasmissione verticale vera e propria o, piuttosto, di un fenomeno di contaminazione superficiale del guscio delle uova. Se così fosse, sarebbe infatti sufficiente individuare un efficace protocollo di disinfezione, in grado di impedire la trasmissione della malattia dai riproduttori infetti alle progenie da essi originate. In caso contrario, ovvero in presenza di una vera e propria trasmissione *intra ovo*, la sola possibilità di evitare l'infezione negli stadi larvali e giovanili dovrà basarsi esclusivamente sull'identificazione ed eliminazione dal parco riproduttivo dei riproduttori infetti oltre, ovviamente, alla necessità di disinfezione dell'acqua in ingresso in avannotteria.

A questo proposito, come suggerito da alcuni autori, lo screening dei riproduttori potrebbe essere vantaggiosamente eseguito con l'adozione di protocolli diagnostici biomolecolari, per

la ricerca del virus nei liquidi ovarici, seminali e biopsie gonadiche e, contemporaneamente, di metodi sierologici, come l'ELISA, per l'evidenziazione della presenza di anticorpi specifici indice di un'infezione pregressa.

Maggiori attenzioni dovrebbero inoltre essere rivolte, in futuro, alle interazioni e scambi di patogeni tra gli animali allevati e le popolazioni selvatiche, per valutare i rischi di trasmissione dell'infezione da un ambiente all'altro.

Malgrado tutti gli sforzi che possano essere messi in atto e le più restrittive misure adottabili, si ritiene che la soluzione ottimale potrà essere raggiunta solo nel momento in cui sarà disponibile un vaccino efficace.

RINGRAZIAMENTI

Un sincero ringraziamento va ai colleghi che hanno fornito il materiale fotografico relativo alla microscopia elettronica (dr. Montesi Francesco), istopatologia ed immunoistochimica (dr. Franco Mutinelli, dr.ssa Marta Vascellari) e al dr. Fabio Borghesan per l'assidua assistenza in campo.

REFERENCES – BIBLIOGRAFIA

- Aranguren R., Tafalla C., Novoa B. & Figueras A. (2002). Nodavirus replication in a turbot cell line. *J. Fish Dis.*, 25: 361- 366.
- Arcier J.M., Herman F., Lightner D.V., Redman R.M., Mari J. & Bonami J.R. (1999). A viral disease associated with mortalities in hatchery-reared postlarvae of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Dis. Aquat. Org.*, 38: 177-181.
- Arimoto M., Maruyama K. & Furusawa I. (1994). Epizootiology of viral nervous necrosis (VNN) in striped jack. *Fish Pathol.*, 29: 19-24.
- Arimoto M., Mori K., Nakai T., Muroga K. & Furusawa I. (1993). Pathogenicity of the causative agent of viral nervous necrosis disease in striped jack, *Pseudocaranx dentex* (Bloch & Schneider). *J. Fish Dis.*, 16: 461-469.
- Arimoto M., Mushiake K., Mizuta Y., Nakai T., Muroga K. & Furusawa I. (1992). Detection of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Fish Pathol.*, 27: 191-195.
- Arimoto M., Sato J., Maruyama K., Mimura G. & Furusawa I. (1996). Effect of chemical and physical treatments on the inactivation of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV). *Aquaculture*, 143: 15-22.
- Aspehaug V., Devold M. & Nylund A. (1999). The phylogenetic relationship of nervous necrosis virus from halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Bull. Eur. Fish Pathol.*, 19: 196-202.
- Athanassopoulou F., Billinis C. & Prapas T. (2004). Important disease conditions of newly cultured species in intensive freshwater farms in Greece: first incidence of nodavirus infection in *Acipenser* sp. *Dis. Aquat. Org.*, 60: 247-252.
- Athanassopoulou F., Billinis C., Psychas V. & Karipoglou K. (2003). Viral encephalopathy and retinopathy of *Dicentrarchus labrax* (L.) farmed in fresh water in Greece. *J. Fish Dis.*, 26: 361-365.
- Awang A.B. (1987). Sea bass (*Lates calcarifer*) larvae and fry production in Malaysia. In: *Management of wild and cultured sea bass/barramundi Lates calcarifer*. Ed. by J.W. Copland & D.I. Grey, ACIAR, Canberra: 144-147.
- Azad I.S., Shekhar M.S., Thirunavukkarasu A.R., Poornima M., Kailasam M., Rajan J.J.S., Ali S.A., Abraham M. & Ravichandran P. (2005). Nodavirus infection causes mortalities in hatchery produced larvae of *Lates calcarifer*: first report from India. *Dis. Aquat. Org.*, 63: 113-118.
- Barker D.E., MacKinnon A.M., Boston L., Burt M.D.B., Cone D.K., Speare D.J., Griffiths S., Cook M., Ritchie R. & Olivier G. (2002). First report of piscine nodavirus infecting wild winter flounder *Pleuronectes americanus* in Passamaquoddy Bay, New Brunswick, Canada. *Dis. Aquat. Org.*, 49: 99-105.
- Bellance R. & Gallet de Saint-Aurin D. (1988). L'encéphalite virale du loup de mer. *Caraibes Medical*: 105-114.
- Beraldo P., De Nigris G., Rogato F. & Galeotti M. (2007). Histological and immunohistochemistry findings of viral encephalopathy-rethinopathy in gilthead seabream larvae (*Sparus aurata*, L. 1578) reared in Italy. *13th International Conference of the EAFP "Diseases of Fish and Shellfish", European Association of Fish Pathologists, Grado (UD) - Italy, 17-22 September 2007*: 140.

- Bloch B., Gravningen K. & Larsen J.L. (1991). Encephalomyelitis among turbot associated with a picornavirus-like agent. *Dis. Aquat. Org.*, 10: 65-70.
- Bondad-Reantaso M.G., Kanchanakhan S. & Chinabut S. (2000). Review of grouper diseases and health management strategies for grouper and marine finfish diseases. In: *APE-CFWG02/2000 Workshop. Development of a regional research program on grouper virus transmission and vaccine development, Bangkok, 18-20 October 2000*: 27-60.
- Boonyaratpalin S., Supamattaya K., Kasornchandra J. & Hoffmann R. (1996). Picorna-like virus associated with mortality and a spongious encephalopathy in grouper *Epinephelus malabaricus*. *Dis. Aquat. Org.*, 26: 75-80.
- Borghesan F., Selli L., Manfrin A., Mutinelli F., Qualtieri K, Ormelli S. & Bovo G. (2003). Winter outbreak of viral encephalo-retinopathy in farmed seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Boll. Soc. It. Patol. Ittica*, 36: 15-23.
- Bovo G., Borghesan F., Mutinelli F., Montesi F. & Comuzzi M. (1996). Viral Encephalo-retinopathy of reared sea bass: first detection in Italy. *Boll. Soc. It. Patol. Ittica*, 19: 52-64.
- Bovo G., Nishizawa T., Maltese C., Borghesan F., Mutinelli F., Montesi F. & De Mas S. (1999a). Viral encephalopathy and retinopathy of farmed marine fish species in Italy. *Virus Research*, 63: 143-146.
- Bovo G., Maltese C., Borghesan F., Mutinelli F., Rosin R. & Montesi F. (1999b). A rapid and efficient method for diagnosing viral encephalo-retinopathy in symptomatic specimens. *9th International Conference "Diseases of Fish and Shellfish", European Association of Fish Pathologists, Rhodes (Greece), 19-24 September 1999*: Poster 162.
- Breuil G., Bonami J.R., Pepin J.F. & Pichot Y. (1991). Viral infection (picorna-like virus) associated with mass mortalities in hatchery-reared sea-bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae and juveniles. *Aquaculture*, 97: 109-116.
- Breuil G., Mouchel O., Fauvel C. & Pepin J.F. (2001). Sea bass *Dicentrarchus labrax* nervous necrosis virus isolates with distinct pathogenicity to sea bass larvae. *Dis. Aquat. Org.*, 45: 25-31.
- Breuil G., Pepin J.F., Boscher S. & Thiéry R. (2002). Experimental vertical transmission of nodavirus from broodfish to eggs and larvae of the sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.). *J. Fish Dis.*, 25: 697-702.
- Breuil G., Pepin J.F., Castric J., Fauvel C. & Thiery R. (2000). Detection of serum antibodies against nodavirus in wild and farmed adult sea bass: application to the screening of broodstock in sea bass hatcheries. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 20: 95-100.
- Breuil G. & Romestand B. (1999). A rapid ELISA method for detecting specific antibody level against nodavirus in the serum of the sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.): application to the screening of spawners in a sea bass hatchery. *J. Fish Dis.*, 22: 45-52.
- Carstens E.B., Estes M.K., Lemon S.M., Maniloff J., Mayo M.A., McGeoch D.J., Pringle C.R. & Wickner R.B. (2000). Virus Taxonomy. *Academic Press, San Diego*.
- Castric J., Thiéry R., Jeffroy J., De Kinkelin P. & Raymond J.C. (2001). Sea bream *Sparus aurata*, an asymptomatic contagious fish host for nodavirus. *Dis. Aquat. Org.*, 47: 33-38.
- Chang S.F., Ngho G.H. & Kueh S. (1997). Detection of viral nervous necrosis nodavirus by reverse transcription polymerase chain reaction in locally farmed marine food fish. *Singapore Vet. J.*, 21: 39-44.

- Chang S.F., Ngoh G.H., Kueh L.F.S., Qin Q.W., Chen C.L., Lam T.J. & Sin Y.M. (2001). Development of a tropical marine fish cell line from Asian seabass (*Lates calcarifer*) for virus isolation. *Aquaculture*, 193: 133-145.
- Chi S.C., Hu W.W. & Lo B.J. (1999a). Establishment and characterization of a continuous cell line (GF-1) derived from grouper, *Epinephelus coioides* (Hamilton): a cell line susceptible to grouper nervous necrosis virus (GNNV). *J. Fish Dis.*, 22: 173-182.
- Chi S.C., Lee K.W. & Hwang S.J. (2001). Investigation of host range of fish nodavirus in Taiwan. In: *10th International Conference of the European Association of Fish Pathologists, Dublin (Ireland), 9-14 september 2001*: Abstract 0-49.
- Chi S.C., Lin S.C., Su H.M. & Hu W.W. (1999b). Temperature effect on nervous necrosis virus infection in grouper cell line and in grouper larvae. *Virus Res.*, 63: 107-114.
- Chi S.C., Lo C.F., Kou G.H., Chang P.S., Peng S.E. & Chen S.N. (1997). Mass mortalities associated with viral nervous necrosis (VNN) disease in two species of hatchery-reared grouper, *Epinephelus fuscogutatus* and *Epinephelus akaara* (Temminck & Schlegel). *J. Fish Dis.*, 20: 185-193.
- Chi S.C., Shieh J.R. & Lin S.J. (2003). Genetic and antigenic analysis of betanodaviruses isolated from aquatic organisms in Taiwan. *Dis. Aquat. Org.*, 55: 221-228.
- Chi S.C., Wu Y.C. & Cheng T.M. (2005). Persistent infection of betanodavirus in a novel cell line derived from the brain tissue of barramundi *Lates calcarifer*. *Dis. Aquat. Org.*, 65: 91-98.
- Chua F.H.C., Loo J.J. & Wee J.K. (1995). Mass mortality in juvenile greasy grouper, *Epinephelus tauvina*, associated with vacuolating encephalopathy and retinopathy. In: *M. Shariff, J.R. Arthur and P. Subhasinghe, Editors, Diseases in Asian Aquaculture II, Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila*: 235-241.
- Ciulli S., Di Marco P., Natale A., Galletti E., Battilani M., Scagliarini A., Purpari G., Cannella V., Castiglione F. & Guercio A. (2006b). Detection and characterization of Betanodavirus in wild fish from Sicily, Italy. *Ittiopatologia*, 3: 101-112.
- Ciulli S., Galletti E., Gallina L., Vaccari F. & Prosperi S. (2006a). Detection and quantification of betanodavirus by real time PCR. *Vet. Res. Commun.*, 30, suppl. 1: 235-238.
- Coerdacier J.L., Laporte F. & Pepin J.F. (2003). Preliminary approach to find synthetic peptides from nodavirus capsid potentially protective against sea bass viral encephalopathy and retinopathy. *Fish Shellfish Immunol.*, 14: 435-447.
- Comps M., Pepin J.F. & Bonami J.R. (1994). Purification and characterization of two fish encephalitis viruses (FEV) infecting *Lates calcarifer* and *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture*, 123: 1-10.
- Comps M. & Raymond J.C. (1996). Virus-like particles in the retina of the sea-bream, *Sparus aurata*. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 16: 161-163
- Comps M., Trindade M. & Delsert C. (1996). Investigation of fish encephalitis viruses (FEV) expression in marine fishes using DIG-labelled probes. *Aquaculture*; 143: 113-121.
- Curtis P.A., Drawbridge M., Iwamoto T., Nakai T., Hedrick R.P. & Gendron A.P. (2001). Nodavirus infection of juvenile white sea bass, *Atractoscion nobilis*, cultured in southern California: first record of viral nervous necrosis (VNN) in North America. *J. Fish Dis.*, 24: 263-271.

- Dalla Valle L., Negrisolò E., Patarnello P., Zanella L., Maltese C., Bovo G. & Colombo L. (2001). Sequence comparison and phylogenetic analysis of fish nodaviruses based on the coat protein gene. *Arch. Virol.*, 146: 1125-1137.
- Dalla Valle L., Toffolo V., Lamprecht M., Maltese C., Bovo G., Belvedere P. & Colombo L. (2005). Development of a sensitive and quantitative diagnostic assay for fish nervous necrosis virus based on two-target real-time PCR. *Vet. Microbiol.*, 110: 167-179.
- Dalla Valle L., Zanella L., Patarnello P., Paolucci L., Belvedere P. & Colombo L. (2000). Development of a sensitive diagnostic assay for fish nervous necrosis virus based on RT-PCR plus nested PCR. *J. Fish Dis.*, 23: 321-327.
- Danayadol Y., Direkbusarakom S. & Supamattaya K. (1995). Viral nervous necrosis in brownspotted grouper, *Epinephelus malabaricus*, cultured in Thailand. In: Shariff M., Arthus J.R., Subasunghe R.P. (eds). *Diseases in Asian aquaculture II. Fish Health section, Asian Fisheries Society, Manila*: 227-233.
- Dannevig B.H., Nilsen R., Modahl I., Jankowska M., Taksdal T. & Press C.McL. (2000). Isolation in cell culture of nodavirus from farmed Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* in Norway. *Dis. Aquat. Org.*, 43: 183-189.
- Delsert C., Morin N. & Comps M. (1997a). Fish nodavirus lytic cycle and semipermissive expression in mammalian and fish cell culture. *J. Virol.*, 71, 7: 5673-5677.
- Delsert C., Morin N. & Comps M. (1997b). A fish encephalitis virus that differs from other nodaviruses by its capsid protein processing. *Arch. Virol.*, 142: 2359-2371.
- De Mas S., Vicari N., Pellati D., Bertazzo V., Bovo G., Borghesan F., Montesi F., Mutinelli F., Dalla Valle L. & Tisato E. (1998). RT-PCR technique application for seabass (*Dicentrarchus labrax*) viral encephalo-retinopathy diagnosis. *Boll. Soc. It. Patol. Ittica*, 23: 11-23.
- Frerichs G.N., Morgan D., Hart D., Skerrow C., Roberts R.J. & Onion D.E. (1991). Spontaneously productive C-type retrovirus infection of fish cell line. *J. Gen. Virol.*, 72: 2537-2539.
- Frerichs G.N., Rodger H.D. & Peric Z. (1996). Cell culture isolation of piscine neuropathy nodavirus from juvenile sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *J. Gen. Virol.*, 77: 2067-2071.
- Frerichs G.N., Tweedie A., Starkey W.G. & Richards R.H. (2000). Temperature, pH and electrolyte sensitivity, and heat, UV and disinfectant inactivation of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) neuropathy nodavirus. *Aquaculture*, 185: 13-24.
- Fryer J.L. & Lannan C.N. (1994). Three decades of cell culture: a current listing of cell lines derived from fishes. *J. Tiss. Cult. Methods*, 10: 57-94.
- Fukuda Y., Nguyen H.D., Furuhashi M. & Nakai T. (1996). Mass mortality of cultured sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus*, associated with viral nervous necrosis. *Fish Pathol.*, 31, 3: 165-170.
- Furusawa R., Okinaka Y. & Nakai T. (2006). Betanodavirus infection in the freshwater model fish medaka (*Oryzias latipes*). *J. General Virol.*, 87: 2333-2339.
- Gagnè N., Johnson S.C., Cook-Versloot M., MacKinnon A.M. & Olivier G. (2004). Molecular detection and characterization of nodavirus in several marine fish species from the northeastern Atlantic. *Dis. Aquat. Org.*, 62: 181-189.

- Galeotti M., Beraldo P., Patarnello P., Sarli G. & Volpatti D. (1999). Encefalopatia-retinopatia virale (VER-VNN) in giovanili di branzino (*D. labrax*) in assenza di lesioni tipiche di vacuolizzazione cellulare. *Boll. Soc. It. Patol. Ittica*, 27: 45-56.
- Glazebrook J.S. (1995). Disease risks associated with traslocation of a virus lethal for barramundi (*Lates calcarifer*). *Thesis*.
- Glazebrook J.S. & Campbell R.S.F. (1987). Diseases of barramundi (*Lates calcarifer*) in Australia: a review. *In: Management of Wild and Cultured Sea Bass/ Barramundi Lates calcarifer. Ed by J.W. Copland & D.I. Grey, ACIAR, Canberra: 204-206.*
- Glazebrook J.S., Heasman M.P. & De Beer S.W. (1990). Picorna-like viral particles associated with mass mortalities in larval barramundi, *Lates calcarifer* (Bloch). *J. Fish Dis.*, 13: 245-249.
- Gomez D.K., Lim D.J., Baeck G.W., Youn H.J., Shin N.S., Youn H.Y., Hwang C.Y., Park J.H. & Park S.C. (2006). Detection of betanodaviruses in apparently healthy aquarium fishes and invertebrates. *J. Vet. Sci.*, 4: 369-374.
- Gomez D.K., Sato J., Mushiake K., Isshiki T., Okinata Y. & Nakai T. (2004). PCR-based detection of betanodaviruses from cultured and wild marine fish with no clinical signs. *J. Fish Dis.*, 27: 603-608.
- Grotmol S. (2000). Nodavirus infections of farmed fish with emphasis on Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* L. *PhD. Thesis, University of Bergen*.
- Grotmol S., Bergh Ø. & Totland G.K. (1999). Transmission of viral encephalopathy and retinopathy (VER) to yolk-sac larvae of the Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus*: occurrence of nodavirus in various organs and a possible route of infection. *Dis. Aquat. Org.*, 36: 95-106.
- Grotmol S., Nerland A.H., Biering E., Totland G.K. & Nishizawa T. (2000). Characterisation of the capsid protein gene from a nodavirus strain affecting the Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* and design of an optimal reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) detection assay. *Dis. Aquat. Org.*, 39: 79-88.
- Grotmol S. & Totland G.K. (2000). Surface disinfection of Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* eggs with ozonated sea-water inactivates nodavirus and increases survival of the larvae. *Dis. Aquat. Org.*, 39: 89-96.
- Grotmol S., Totland G.K. & Kryvi H. (1997a). Detection of a nodavirus-like agent in heart tissue from reared Atlantic salmon *Salmo salar* suffering from cardiac myopathy syndrome (CSM). *Dis. Aquat. Org.*, 29: 79-84.
- Grotmol S., Totland G.K., Kvellestad A., Fjell K. & Olsen A.B. (1995). Mass mortality of larval and juvenile hatchery-reared halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) associated with the presence of virus-like particles in vacuolated lesions in the central nervous system and retina. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 15, 5: 176-180.
- Grotmol S., Totland G.K., Thorud K. & Hjeltnes B.K. (1997b). Vacuolating encephalopathy and retinopathy associated with a nodavirus-like agent: a probable cause of mass mortality of cultured larval and juvenile Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus*. *Dis. Aquat. Org.*, 29: 85-97.
- Grove S., Faller R., Soleim K.B. & Dannevig B.H. (2005). Absolute quantitation of RNA by a competitive real-time RT-PCR method using piscine nodavirus as a model. *J. Virol. Methods*, 132: 104-112.

- Grove S., Johansen R., Dannevig B.H., Reitan L.J. & Ranheim T. (2003). Experimental infection of Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* with nodavirus: tissue distribution and immune response. *Dis. Aquat. Org.*, 53: 211-221.
- Grove S., Johansen R., Reitan L.J., Press C.McL. & Dannevig B.H. (2006). Quantitative investigation of antigen and immune response in nervous and lymphoid tissues of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) challenged with nodavirus. *Fish Shellfish Immunol.*, 21, 5: 525-539.
- Hart D., Frerichs G.N., Rambaut A. & Onion D.E. (1996). Complete nucleotide sequence and transcriptional analysis of the snakehead fish retrovirus. *J. Virol.*, 70: 3606-3616.
- Hegde A., Teh H.C., Lam T.J. & Sin Y.M. (2003). Nodavirus infection in freshwater ornamental fish, guppy, *Poecilia reticulata* - comparative characterization and pathogenicity studies. *Arch. Virol.*, 148: 575-586.
- Huang B., Tan C., Chang S.F., Munday B., Mathew J., Ngoh G.H. & Kwang J. (2001). Detection of nodavirus in barramundi, *Lates calcarifer* (Bloch), using recombinant coat protein-based ELISA and RT-PCR. *J. Fish Dis.*, 24: 135-141.
- Husgarð S., Grotmol S., Hjeltnes B.K., Rodseth O.M. & Biering E. (2001). Immune response to a recombinant capsid protein of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) in turbot *Scophthalmus maximus* and Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus*, and evaluation of a vaccine against SJNNV. *Dis. Aquat. Org.*, 45: 33-44.
- Iwamoto T., Mise K., Mori K., Arimoto M., Nakai T. & Okuno T. (2001a). Establishment of an infectious RNA transcription system for Striped jack nervous necrosis virus, the type species of the betanodaviruses. *J. Gen. Virol.*, 82: 2653-2662.
- Iwamoto T., Mori K., Arimoto M. & Nakai T. (1999). High permissivity of the fish cell line SSN-1 for piscine nodaviruses. *Dis. Aquat. Org.*, 39: 37-47.
- Iwamoto T., Mori K., Arimoto M. & Nakai T. (2001b). A combined cell-culture and RT-PCR method for rapid detection of piscine nodaviruses. *J. Fish Dis.*, 24: 231-236.
- Iwamoto T., Nakai T., Mori K., Arimoto M. & Furusawa I. (2000). Cloning of the fish cell line SSN-1 for piscine nodaviruses. *Dis. Aquat. Org.*, 43: 81-89.
- Johansen R., Amundsen M., Dannevig B.H. & Sommer A.I. (2003). Acute and persistent experimental nodavirus infection in spotted wolffish *Anarhichas minor*. *Dis. Aquat. Org.*, 57: 35-41.
- Johansen R., Grove S., Svendsen A.K., Modahl I. & Dannevig B. (2004a). A sequential study of pathological findings in Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* (L.), throughout one year after an acute outbreak of viral encephalopathy and retinopathy. *J. Fish Dis.*, 27: 327-341.
- Johansen R., Ranheim T., Hansen M.K., Taksdal T. & Totland G.K. (2002). Pathological changes in juvenile Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* persistently infected with nodavirus. *Dis. Aquat. Org.*, 50: 161-169.
- Johansen R., Sommerset I., Tørud B., Korsnes K., Hjortaa M.J., Nilsen F., Nerland A.H. & Dannevig B.H. (2004b). Characterization of nodavirus and viral encephalopathy and retinopathy in farmed turbot, *Scophthalmus maximus* (L.). *J. Fish Dis.*, 27, 10: 591-601.
- Johnson S.C., Groman D.B., Cusack R.R., Sperker S.A., Leggiadro C.T., Ritchie R.J. & Cook M.D. (2001). Identification and characterization of a piscine neuropathy nodavirus from juvenile Atlantic

cod (*Gadus morhua*). In: 10th International Conference of the European Association of Fish Pathologists, Dublin (Ireland), 9-14 september 2001: Abstract P-045.

Johnson S.C., Sperker S.A., Leggiadro C.T., Groman D.B., Griffiths S.G., Ritchie R.J., Cook M.D. & Cusack R.R. (2002). Identification and characterization of a Piscine Neuropathy and Nodavirus from juvenile Atlantic cod from the Atlantic Coast of North America. *J. Aquat. Anim. Health*, 14: 124-133.

Jung S.J., Miyazaki T., Miyata M. & Oishi T. (1996). Histopathological studies on viral nervous necrosis in a new host Japanese sea bass *Lateolabrax japonicus*. *Bull. Faculty Bioresources, Mie University*, 6: 9-16.

Kim S.R., Jung S.J., Kim Y.J., Kim J.D., Jung T.S., Choi T.J., Yoshimizu M. & Oh M.J. (2001). Phylogenetic comparison of Viral Nervous Necrosis (VNN) Viruses occurring seed production period. *J. Korean Fisheries Soc.*, 35: 237-241.

Lai Y.S., Chiu H.C., Murali S., Guo I.C., Chen S.C., Fang K. & Chan C.Y. (2001a). *In vitro* neutralization by monoclonal antibodies against yellow grouper nervous necrosis virus (YGNNV) and immunolocalization of virus infection in yellow grouper, *Epinephelus awoara* (Temminck & Schlegel). *J. Fish Dis.*, 24: 237-244.

Lai Y.S., John J.A.C., Lin C.H., Guo I.C., Chen S.C., Fang K., Lin C.H. & Chan C.Y. (2003). Establishment of cell lines from a tropical grouper, *Epinephelus awoara* (Temminck & Schlegel), and their susceptibility to grouper irido- and nodaviruses. *J. Fish Dis.*, 26: 31-42.

Lai Y.S., Murali S., Chiu H.C., Ju H.Y., Lin Y.S., Chen S.C., Guo I.C., Fang K. & Chan C.Y. (2001b). Propagation of yellow grouper nervous necrosis virus (YGNNV) in a new nodavirus-susceptible cell line from yellow grouper, *Epinephelus awoara* (Temminck & Schlegel), brain tissue. *J. Fish Dis.*, 24: 299-309.

Le Breton A., Grisez L., Sweetman J. & Ollevier F. (1997). Viral nervous necrosis (VNN) associated with mass mortalities in cage-reared sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.). *J. Fish Dis.*, 20: 145-151.

Lee K.W., Chi S.C. & Cheng T.M. (2002). Interference of the life cycle of fish nodavirus with fish retrovirus. *J. Gen. Virol.*, 83: 2469-2474.

Li W.H., Tanimura N. & Sharp P.M. (1988). Rate and dates of divergence between AIDS virus nucleotide sequences. *Mol. Biol. Evol.*, 5: 313-330.

Lin C.-C., Lin J.H.-Y., Chen M.-S. & Yang H.-L. (2007). An oral nervous necrosis virus vaccine that induces protective immunity in larvae of grouper (*Epinephelus coioides*). *Aquaculture*, 268, 1-4: 265-273.

Maeno Y., de la Peña L.D. & Cruz-Lacierda E. (2002). Nodavirus infection in hatchery-reared Orange-Spotted Grouper *Epinephelus coioides*: first record of viral nervous necrosis in the Philippines. *Fish Pathol.*, 37, 2: 87-89.

Maltese C., Antonetti P., Quartesan R., Ormelli S., Borghesan F., Manfrin A., Selli L., Castiglione F., Ferrantelli V., Guercio A. & Bovo G. (2005). Isolation of viral encephalopathy and retinopathy virus (VERV) from wild marine fish species in the Mediterranean sea. In: 12th International Conference "Diseases of Fish and Shellfish", European Association of Fish Pathologists, Copenhagen (Denmark), 11-16 September 2005: Poster 8.19.

Maltese C. & Bovo G. (2001). Effects of some chemico-physical treatments on the virus causing encephalo-retinopathy in farmed sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Boll. Soc. It. Patol. Ittica*, 31: 3-16.

- Mladineo I. (2003). The immunohistochemical study of nodavirus changes in larval, juvenile and adult sea bass tissue. *J. Appl. Ichthyol.*, 19: 366-370.
- Mori K., Mangyoku T., Iwamoto T., Arimoto M., Tanaka S. & Nakai T. (2003). Serological relationships among genotypic variants of betanodavirus. *Dis. Aquat. Org.*, 57: 19-26.
- Mori K., Nakai T., Muroga K., Arimoto M., Mushiake K. & Furusawa I. (1992). Properties of a new virus belonging to Nodaviridae found in larval striped jack (*Pseudocaranx dentex*) with nervous necrosis. *Virology*, 187: 368-371.
- Mori K., Nakai T., Nagahara M., Muroga K., Mekuchi T. & Kanno T. (1991). A viral disease in hatchery-reared larvae and juveniles of redspotted grouper. *Fish Pathol.*, 26: 209-210.
- Mori K., Sugaya T., Nishioka T., Gomez D.K., Fujinamy Y., Oka M., Arimoto M., Okinaka Y. & Nakai T. (2005). Detection of betanodaviruses from feed fish used in marine aquaculture. In: *12th International Conference "Diseases of Fish and Shellfish", European Association of Fish Pathologists, Copenhagen (Denmark), 11-16 September 2005*: Abstract O-146.
- Munday B.L., Kwang J. & Moody N. (2002). Betanodavirus infections of teleost fish: a review. *J. Fish Dis.*, 25: 127-142.
- Munday B.L., Langdon J.S., Hyatt A. & Humphrey J.D. (1992). Mass mortality associated with a viral-induced vacuolating encephalopathy and retinopathy of larval and juvenile barramundi, *Lates calcarifer* (Bloch). *Aquaculture*, 103: 197-211.
- Munday B.L. & Nakai T. (1997). Special topic review: nodaviruses as pathogens in larval and juvenile marine finfish. *World J. Microb. Biotech.*, 13: 375-381.
- Muroga K. (1995). Viral and bacterial diseases in larval and juvenile marine fish and shellfish: a review. *Fish Pathol.*, 30: 71-85.
- Mushiake K., Arimoto M., Nishizawa T., Furusawa T., Furusawa I., Nakai T. & Muroga K. (1992). Detection of antibodies against striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) from brood stocks of striped jack. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 58: 2351-2356.
- Mushiake K., Nishizawa T., Nakai T., Furusawa I. & Muroga K. (1994). Control of VNN in striped jack: selection of spawners based on the detection of SJNNV gene by polymerase chain reaction (PCR). *Fish Pathol.*, 29: 177-182.
- Mutinelli F., Bozza M.A., Basilicata L. & Bovo G. (1998). Diagnosi istologica ed immunoistochimica della Encefaloretinopatia virale della spigola di allevamento (*Dicentrarchus labrax*). *Boll. Soc. It. Patol. Ittica*, 23: 1-10.
- Nagai T. & Nishizawa T. (1999). Sequence of the non-structural protein gene encoded by RNA1 of striped jack nervous necrosis virus. *J. Gen. Virol.*, 80: 3019-3022.
- Nakai T., Nguyen H.D., Nishizawa T., Muroga K., Arimoto M. & Ootsuki K. (1994). Occurrence of viral nervous necrosis in kelp grouper and tiger puffer. *Fish Pathol.*, 29: 211-212.
- Nguyen H.D., Mekuchi T., Imura K., Nakai T., Nishizawa T. & Muroga K. (1994). Occurrence of viral nervous necrosis (VNN) in hatchery-reared juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fisheries Science*, 60: 551-554.
- Nguyen H.D., Mushiake K., Nakai T. & Muroga K. (1997). Tissue distribution of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) in adult striped jack. *Dis. Aquat. Org.*, 28: 87-91.

- Nguyen H.D., Nakai T. & Muroga K. (1996). Progression of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) infection in naturally and experimentally infected striped jack *Pseudocaranx dentex* larvae. *Dis. Aquat. Org.*, 24: 99-105.
- Nishizawa T., Furuhashi M., Nagai T., Nakai T. & Muroga K. (1997). Genomic classification of fish nodaviruses by molecular phylogenetic analysis of the coat protein gene. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 4: 1633-1636.
- Nishizawa T., Kise M., Nakai T. & Muroga K. (1995a). Neutralizing monoclonal antibodies to striped jack nervous necrosis virus (SJNNV). *Fish Pathol.*, 30, 2: 111-114.
- Nishizawa T., Mori K., Furuhashi M., Nakai T., Furusawa I. & Muroga K. (1995b). Comparison of the coat protein genes of five fish nodaviruses, the causative agents of viral nervous necrosis in marine fish. *J. Gen. Virol.*, 76: 1563-1569.
- Nishizawa T., Mori K., Nakai T., Furusawa I. & Muroga K. (1994). Polymerase chain reaction (PCR) amplification of RNA of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV). *Dis. Aquat. Org.*, 18: 103-107.
- Nishizawa T., Muroga K. & Arimoto M. (1996). Failure of the polymerase chain reaction (PCR) method to detect striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) in striped jack *Pseudocaranx dentex* selected as spawners. *J. Aquat. Anim. Health*, 8: 332-334.
- Oh M.J., Jung S.J., Kim S.R., Rajendran K.V., Kim Y.J., Choi T.J., Kim H.R. & Kim J.D. (2002). A fish nodavirus associated with mass mortality in hatchery-reared red drum, *Sciaenops ocellatus*. *Aquaculture*, 211: 1-7.
- O.I.E. (Office Internationales Epizooties) (2006). Viral Encephalopathy and Retinopathy. In: *Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animal, Office International des Epizooties (OIE), Paris, France* : 169-175.
- Pantel S., Korsnes K., Bergh O., Vik-Mo F., Pedersen J. & Nerland A.H. (2007). Nodavirus in farmed Atlantic cod *Gadus morhua* in Norway. *Dis. Aquat. Org.*, 77: 169-173.
- Pantoja C.R., Tang K.F.J., Redman R. & Lightner D.V. (2007). Identification of a nodavirus that causes muscle necrosis in *Litopenaeus vannamei* and the development of an in situ hybridization and RT-PCR assay for its detection. *Meeting abstract World Aquaculture Society*.
- Pavoletti E., Prearo M., Ghittino M. & Ghittino C. (1998). Casi di encefaloretinopatia in ombrina (*Umbrina cirrosa*) con descrizione della sintomatologia clinica e del quadro anatomoistopatologico. *Boll. Soc. Patol. Ittica*, 23: 24-33.
- Peducasse S., Castric J., Thiery R., Jeffroy J., Le Ven A. & Baudin Laurencin F. (1999). Comparative study of viral encephalopathy and retinopathy in juvenile sea bass *Dicentrarchus labrax* infected in different ways. *Dis. Aquat. Org.*, 36: 11-20.
- Qin Q.W., Wu T.H., Jia T.L., Hedge A. & Zhang R.Q. (2006). Development and characterization of a new tropical marine fish cell line from grouper, *Epinephelus coioides* susceptible to iridovirus and nodavirus. *J. Virol. Methods*, 131: 58-64.
- Renault T., Haffner P., Baudin Laurencin F., Breuil G. & Bonami J.R. (1991). Mass mortalities in hatchery-reared sea bass (*Lates calcarifer*) larvae associated with the presence in the brain and retina of virus-like particles. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 11, 2: 68-73.

- Schneemann A., Ball L.A., Delsert C., Johnson J.E. & Nishizawa T. (2005). Family Nodaviridae. In: *Virus Taxonomy. Eight Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses*. C.M., Fauquet, M.A., Mayo, J. Maniloff., U. Desselberger and L.A. Ball. (eds.), Elsevier, Academic Press, New York: 865-872.
- Schneemann A. & Marshall D. (1998). Specific encapsidation of nodavirus RNAs is mediated through the C terminus capsid precursor protein alpha. *J. Virol.*, 72: 8738-8746.
- Sideris D.C. (1997). Cloning, expression and purification of the coat protein of encephalitis virus (DIEV) infecting *Dicentrarchus labrax*. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, 42: 409-417.
- Skliris G.P., Krondiris J.V., Sideris D.C., Shinn A.P., Starkey W.G. & Richards R.H. (2001). Phylogenetic and antigenic characterization of new fish nodavirus isolates from Europe and Asia. *Virus Res.*, 75: 59-67.
- Skliris G.P. & Richards R.H. (1998). Assessment of the susceptibility of the brine shrimp *Artemia salina* and rotifer *Brachionus plicatilis* to experimental nodavirus infections. *Aquaculture*, 169: 133-141.
- Skliris G.P. & Richards R.H. (1999a). Induction of nodavirus disease in seabass, *Dicentrarchus labrax*, using different infection models. *Virus Res.*, 63: 85-93.
- Skliris G.P. & Richards R.H. (1999b). Nodavirus isolated from experimentally infected tilapia, *Oreochromis mossambicus* (Peters). *J. Fish Dis.*, 22: 315-318.
- Sohn S.G. & Park M.A. (1998). Viral diseases of cultured marine fish and shrimp in Korea. *Fish Pathol.*, 33: 189-192.
- Sommerset I., Hsgaard S. & Nerland A.H. (2001). Development of a vaccine against nodavirus infection in Atlantic halibut. In: *Proceedings of the 10th International Conference "Diseases of Fish and Shellfish", European Association of Fish Pathologists, Dublin (Ireland), 9-14 September 2001*: Abstract 113.
- Sommerset I., Lorenzen E., Lorenzen N., Bleie H. & Nerland A.H. (2003). A DNA vaccine directed against a rainbow trout rhabdovirus induces early protection against a nodavirus challenge in turbot. *Vaccine*, 21: 4661-4667.
- Sommerset I. & Nerland A.H. (2004). Complete sequence of RNA1 and subgenomic RNA3 of Atlantic halibut nodavirus (AHNV). *Dis. Aquat. Org.*, 58: 117-125.
- Sommerset I., Skern R., Biering E., Bleie H., Fiksdal I.U., Grove S. & Nerland A.H. (2005). Protection against Atlantic halibut nodavirus in turbot is induced by recombinant capsid protein vaccination but not following DNA vaccination. *Fish Shellfish Immunol.*, 18: 13-29.
- Starkey W.G., Ireland J.H., Muir K.F., Jenkins M.E., Roy W.J., Richards R.H. & Ferguson H.W. (2001). Nodavirus infection in Atlantic cod and Dover sole in the UK. *Vet. Record*, 149: 179-181.
- Starkey W.G., Ireland J.H., Muir K.F., Shinn A.P., Richards R.H. & Ferguson H.W. (2000). Isolation of nodavirus from Scottish farmed halibut, *Hippoglossus hippoglossus* (L.). *J. Fish Dis.*, 23: 419-422.
- Starkey W.G., Millar R.M., Jenkins M.E., Ireland J.H., Muir K.F. & Richards R.H. (2004). Detection of piscine nodaviruses by real-time nucleic acid sequence based amplification (NASBA). *Dis. Aquat. Org.*, 59: 93-100.

- Sudhakaran R., Syed Musthaq S., Haribabu P., Mukherjee S.C., Gopal C. & Sahul Hameed A.S. (2006). Experimental transmission of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (MrNV) and extra small virus (XSV) in three species of marine shrimp (*Penaeus indicus*, *Penaeus japonicus* and *Penaeus monodon*). *Aquaculture*, 257: 136-141.
- Sweetman E., Sweetman J., Le Breton A. & Grisez L. (1996). Nodavirus: a review of the findings of the XIV/NODA/95 investigation. In: "Seabass and seabream culture: problems and prospects" *European Aquaculture Society (ed.)*. Verona, Italy, 16-18 October 1996: 87-101.
- Tan C., Huang B., Chang S.F., Ngoh G.H., Munday B., Chen S.C. & Kwang J. (2001). Determination of the complete nucleotide sequences of RNA1 and RNA2 from greasy grouper (*Epinephelus tauvina*) nervous necrosis virus, Singapore strain. *J. Gen. Virol.*, 82: 647-653.
- Tanaka S., Aoki H. & Nakai T. (1998). Pathogenicity of the Nodavirus detected from diseased sevenband grouper *Epinephelus septemfasciatus*. *Fish Pathol.*, 33: 31-36.
- Tanaka S., Mori K., Arimoto M., Iwamoto T. & Nakai T. (2001). Protective immunity of sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus* Thunberg, against experimental viral nervous necrosis. *J. Fish Dis.*, 24: 15-22.
- Thiéry R., Arnauld C. & Delsert C. (1999a). Two isolates of sea bass, *Dicentrarchus labrax* L., nervous necrosis virus with distinct genomes. *J. Fish Dis.*, 22: 201-207.
- Thiéry R., Cozien J., Cabon J., Lamour F., Baud M. & Schneemann A. (2006). Induction of a protective immune response against Viral Nervous Necrosis in the european sea bass *Dicentrarchus labrax* by using Betanodavirus Virus-like particles. *J. Virol.*, 80, 20: 10201-10207.
- Thiéry R., Cozien J., de Boisseson C., Kerbart-Boscher S. & Nevarez L. (2004). Genomic classification of new betanodavirus isolates by phylogenetic analysis of the coat protein gene suggests a low host fish species specificity. *J. Gen. Virol.*, 85: 3079-3087.
- Thiéry R., Peducasse S., Castric J., Le Ven A., Jeffroy J. & Baudin Laurencin F. (1997). Experimental transmission of viral encephalopathy and retinopathy to juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, 17, 3/4: 118-122.
- Thiéry R., Raymond J.C. & Castric J. (1999b). Natural outbreak of viral encephalopathy and retinopathy in juvenile sea bass, *Dicentrarchus labrax*: study by nested reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Virus Res.*, 63: 11-17.
- Totland G.K., Grotmol S., Morita Y., Nishioka T. & Nakai T. (1999). Pathogenicity of nodavirus strains from striped jack *Pseudocaranx dentex* and Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus*, studied by waterborne challenge of yolk-sac larvae of both teleost species. *Dis. Aquat. Org.*, 38: 169-175.
- Ucko M., Colomi A. & Diamat A. (2004). Nodavirus infections in Israeli mariculture. *J. Fish Dis.*, 27: 459-469.
- Watanabe K.I., Nishizawa T. & Yoshumizu M. (2000). Selection of brood stock candidates of barfin flounder using an ELISA system with recombinant protein of barfin flounder nervous necrosis virus. *Dis. Aquat. Org.*, 41: 219-223.
- Watanabe K. & Yoshimizu M. (1999). Susceptibility of fish cell lines against fish nodavirus. *Fish Pathol.*, 34, 4: 213-214.

- Widada S.J., Durand S., Cambournac I., Qian D., Shi Z., Dejonghe E., Richard V. & Bonami J.R. (2003). Genome-based detection methods of *Macrobrachium rosenbergii*: dot-blot, *in situ* hybridization and RT-PCR. *J. Fish Dis.*, 23: 583-590
- Yamashita H., Fujita Y., Kawakami H. & Nakai T. (2005). The efficacy of inactivated virus vaccine against viral nervous necrosis (VNN). *Fish Pathol.*, 40: 15-21.
- Yoshikoshi K. & Inoue K. (1990). Viral nervous necrosis in hatchery-reared larvae and juveniles of Japanese parrotfish, *Oplegnathus fasciatus* (Temminck & Schlegel). *J. Fish Dis.*, 13: 69-77.
- Yoshimizu M., Suzuki K., Nishizawa T., Winton J.R. & Ezura Y. (1997). Antibody screening for the identification of nervous necrosis carriers in flounder broodstock. In : *Proceeding NRIA International Workshop on New approaches to Viral Diseases of Aquatic Animals*, Kyoto: 124-130.
- Yuasa K., Koeshayani K., Roza K., Mori K., Katata M. & Nakai T. (2002). Immune response of humpback grouper, *Chromileptes altivelis* (Valenciennes) injected with the recombinant coatprotein of betanodavirus. *J. Fish. Dis.*, 25: 53-56.
- Zafran, Harada T., Koesharyani I., Yuasa K. & Hatai K. (1998). Indonesian hatchery reared seabass larvae (*Lates calcarifer*) associated with viral nervous necrosis (VNN). *Indonesian Fisheries Res. J.*, 4: 19-22.
- Zafran, Koesharyani I., Johnny F., Yuasa K., Harada T. & Hatai K. (2000). Viral nervous necrosis in humpback grouper *Chromileptes altivelis* larvae and juveniles. *Fish Pathol.*, 35: 95-96.
- Zorriehzahra M.J., Nakai T., Sharifpour I., Gomes D.K., Chi S.-C., Soltani M., Mohd D., Hj H., Sharif Roani M. & Saidi A.A. (2005). Mortality wild golden mullet (*Liza auratus*) in Iranian waters of the Caspian Sea, associated with viral nervous necrosis like agent. *Iran. J. Fish. Sci.*, 45: 43-58.