

Evidenziazione e caratterizzazione di *Betanodavirus* in specie ittiche selvatiche nel mare di Sicilia

Detection and characterization of Betanodavirus in wild fish from Sicily, Italy

Sara Ciulli^{1*}, Patrizia Di Marco², Alessandra Natale¹, Elena Galletti¹,
Mara Battilani¹, Alessandra Scagliarini¹, Giuseppa Purpari²,
Vincenza Cannella², Francesco Castiglione², Annalisa Guercio²

¹ Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale, Alma Mater Studiorum;

² Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia, Palermo.

RIASSUNTO - L'infezione da *Betanodavirus* è cosmopolita ed è responsabile dell'Encefalo-Retinopatia Virale (ERV). Ad oggi l'infezione è stata segnalata in più di 34 specie ittiche. Il ruolo epidemiologico delle singole specie nel mantenimento dell'infezione in natura deve essere ancora chiarito. L'ERV è responsabile di perdite economiche nell'allevamento del branzino (*Dicentrarchus labrax*), mentre è solo raramente osservata in soggetti selvatici. L'importanza della diagnosi dell'infezione in questi soggetti è quindi da ricercare nel loro eventuale ruolo nel mantenimento dell'infezione e nella trasmissione della malattia ai soggetti allevati. In questo studio riportiamo i risultati di un'indagine eseguita su 73 campioni di encefalo prelevati da varie specie ittiche pescate sulle coste della Sicilia. Tutti i campioni sono stati testati per *Betanodavirus* tramite isolamento su colture cellulari e, in seguito alla comparsa dell'effetto citopatico, la positività è stata confermata mediante RT-PCR e sequenziamento del gene della proteina del capsido virale. Da 31 campioni raccolti da soggetti selvatici di triglia (*Mullus barbatus*), ghiozzo (*Gobius niger*), pagello (*Pagellus erythrinus*), merluzzetto (*Trisopterus minutus capelanus*) e sardina (*Sardina pilchardus*), è stato possibile l'isolamento di *Betanodavirus* in coltura cellulare. Questo lavoro ha permesso di evidenziare che l'infezione da *Betanodavirus* è ampiamente diffusa in natura ed in particolare è presente in soggetti selvatici appartenenti alle 5 specie ittiche analizzate. Il sequenziamento e l'analisi filogenetica dei virus isolati hanno evidenziato che si tratta di Redspotted Grouper Nervous Necrosis Virus (RGNNV) e che i ceppi circolanti nei selvatici hanno un alto grado di identità con i ceppi isolati da soggetti allevati, facendo ipotizzare un probabile ed allarmante ruolo di portatori asintomatici per queste specie.

SUMMARY – *Betanodavirus* infection is responsible of the Viral Encephalopathy and Retinopathy (VER) a serious, worldwide fish disease. This virus can infect more than 34 species of fish and the epidemiological role of different fish species needs to be investigated. In the Mediterranean Sea nervous symptoms and mortality due to *Betanodavirus* infection are observed mainly in European sea bass farm (*Dicentrarchus labrax*), while very rarely symptoms are observed in wild fish. Diagnosis of virus infection in wild animals is thus relevant as well as the investigation about their possible role as reservoir or carrier. In this study we report the results of diagnostic tests performed on 73 brain samples from several fish species collected from Sicily. All the samples were tested by SSN-1 cell cultures isolation. Thirty one samples collected from wild *Mullus barbatus*, *Gobius niger*, *Pagellus erythrinus*, *Trisopterus minutus capelanus* and *Sardina pilchardus* showed a specific CPE on cell culture and *Betanodavirus* infection was confirmed by RT PCR and sequencing. Furthermore sequencing and phylogenetic analysis evidenced that *Betanodavirus* involved in the infection were Redspotted Grouper Nervous Necrosis Virus (RGNNV) and that wild strains had high genetic identity with strains collected in affected farmed fish, making us suppose an important role of carrier for wild fish.

Key words: *Betanodavirus*, Viral Encephalopathy and Retinopathy, Wild fish, Sicily, Genetic characterization, Phylogenetic analysis.

* Corresponding Author: c/o Università di Bologna, Facoltà di Medicina Veterinaria, Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale, Viale Vespucci, 2 – 47042 Cesenatico (FC). Tel.: 0547-694948; Fax: 0547-674941; E-mail: sara.ciulli@unibo.it.

INTRODUZIONE

L'infezione da *Betanodavirus* è responsabile di una patologia a sintomatologia nervosa: l'Encefalo-Retinopatia Virale. Questa patologia è stata, ad oggi, segnalata in più di 34 specie ittiche appartenenti a 10 differenti famiglie ed è diffusa in tutto il mondo (Munday *et al.*, 2002; Gagné *et al.*, 2004). Fino ad ora, l'interesse maggiore è stato rivolto allo studio dell'infezione nelle specie di rilevanza commerciale, come ad esempio il branzino europeo *Dicentrarchus labrax*, il rombo *Scophthalmus maximus* o la cernia *Ephinephelus malabaricus*. L'infezione da *Betanodavirus*, anche se in forme asintomatiche, è stata osservata anche nei soggetti selvatici (Barker *et al.*, 2002; Gagné *et al.*, 2004; Gomez *et al.*, 2004; Thiéry *et al.*, 2004), il ruolo epidemiologico dei quali è ancora da chiarire. L'infezione è in grado di trasmettersi sia per via orizzontale che verticale: la trasmissione per via orizzontale è stata dimostrata sperimentalmente in varie specie ittiche per coabitazione di soggetti sani e soggetti malati (Arimoto *et al.*, 1993; Péducasse *et al.*, 1999). L'evidenziazione dell'infezione in soggetti asintomatici selvatici ha fatto sospettare un loro possibile ruolo nella trasmissione per via orizzontale ad animali allevati in condizioni a diretto contatto con l'esterno, come ad esempio le gabbie galleggianti (Le Breton *et al.*, 1997).

I virus responsabili di questa infezione sono i *Betanodavirus*, virus di piccole dimensioni, con capsidi a simmetria icosaedrica, il genoma dei quali è costituito da due segmenti di ssRNA+: l'RNA1 che codifica per la RNA polimerasi-RNA dipendente e l'RNA2 che codifica per la proteina del capsido. Sulla base della sequenza genica di un frammento dell'RNA2, Nishizawa *et al.* (1997) hanno suddiviso i *Betanodavirus* in quattro genotipi: RGNNV, BFNNV, SJNNV e TPNNV; questi virus sono stati recentemente classificati come le 4 specie ufficiali del genere *Betanodavirus* (Fauquet *et al.*, 2005). Questa classificazione genetica trova riscontro sia in diverse caratteristiche biologiche dei virus appartenenti ai 4 genotipi, sia in una diversa distribuzione geografica degli stessi. Fino al 2004, in Europa era stata evidenziata la presenza dei genotipi RGNNV e BFNNV, entrambi a bassa specie-specificità e rispettivamente adattati all'infezione di specie ittiche di acqua calda e di acqua fredda. Recentemente, tuttavia, un ceppo responsabile di nodaviriosi in sogliole d'allevamento (*Solea senegalensis*), in Spagna, è stato assegnato al genotipo SJNNV, un genotipo che fino ad ora era stato isolato solo nei mari giapponesi (Thiéry *et al.*, 2004). Un altro ceppo, isolato da branzini europei allevati in Francia durante un focolaio di Encefalo-Retinopatia Virale scoppiato ad una temperatura di 15°C è risultato, invece, appartenere al genotipo BFNNV, al quale appartengono ceppi adattati all'infezione di specie marine d'acqua fredda: questa rappresenta la prima segnalazione di infezione in branzino con ceppi diversi dal RGNNV (Thiéry *et al.*, 2004).

Alla luce di queste recenti osservazioni, il monitoraggio dell'infezione nelle specie ittiche selvatiche risulta fondamentale, non solo per la comprensione del loro ruolo nella diffusione della malattia in natura, ma anche per il monitoraggio dell'introduzione di nuove varianti.

In questo studio sono stati analizzati 73 campioni provenienti da diverse specie ittiche pescate sulle coste occidentali della Sicilia, nei quali si è indagata la presenza dell'infezione da *Betanodavirus*. I ceppi isolati da alcuni soggetti selvatici sono stati quindi caratterizzati geneticamente per valutare il genotipo coinvolto e la loro somiglianza con i ceppi circolanti nei soggetti di allevamento.

MATERIALI E METODI

Per questa indagine sono stati raccolti 73 campioni ittici pescati (Tabella 1) nelle acque

antistanti le coste della Sicilia occidentale (Figura. 1).

Nome scientifico	N° di soggetti analizzati
<i>Boops</i> sp.	2
<i>Diplodus annularis</i>	1
<i>Gobius niger</i>	17
<i>Merluccius</i> sp.	2
<i>Mullus barbatus barbatus</i>	19
<i>Pagellus</i> sp.	5
<i>Raja</i> sp.	1
<i>Sardina pilchardus</i>	10
<i>Serranus</i> sp.	3
<i>Scorpaena scrofa</i>	1
<i>Scyliorhinus canicula</i>	1
<i>Spicara maena</i>	4
<i>Trachinus draco</i>	1
<i>Trachurus</i> sp.	2
<i>Trigloporus lastoviza</i>	2
<i>Trisopterus minutus</i>	1
<i>Zeus faber</i>	1

Tabella 1 - Nella tabella sono indicati la specie ed il numero di campioni analizzati.
Table 1 - The table shows the species and the number of samples analysed.



Figura 1 – Cartina geografica della zona di prelevamento dei campioni ittici analizzati.
Figure 1 - Geographic map of area where samples came from.

Per ogni campione è stato raccolto il cervello che è stato omogenato, decontaminato con soluzione antibiotata e quindi sottoposto ad indagine per l'isolamento virale su SSN-1 incubando i monostrati alla temperatura di $26^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ (Frerichs *et al.*, 1996; O.I.E., Manual of Diagnostic Test for Aquatic Animals – 4th ed., 2003).

I monostrati sono poi stati osservati al microscopio ogni 24 ore per 10 giorni al fine di evidenziare l'effetto citopatico (ECP). In assenza di ECP è stato effettuato un secondo passaggio cieco.

I lisati cellulari dei campioni che hanno manifestato l'effetto citopatico sono stati quindi sottoposti ad estrazione dell'acido nucleico virale, retrotrascrizione e amplificazione genica. L'estrazione dell'RNA è stata eseguita da 500 μl di surnatante della coltura cellulare tramite TRI-REAGENT (Sigma[®], Germania) seguendo le indicazioni della ditta fornitrice e l'RNA è stato eluito in 40 μl di H₂O addizionata con RNA secure (Ambion[®], USA). L'amplificazione genica è stata condotta tramite RT-PCR in due steps. La reazione di retrotrascrizione è stata condotta con l'enzima Multiscribe Reverse Transcriptase (Perkin Elmer[®], U.S.A.) e con random hexamers. L'amplificazione genica è stata condotta con i primers F2-R3 (Nishizawa *et al.*, 1995) per l'amplificazione del frammento T4 del gene della proteina del capsido che comprende la regione variabile del gene sulla base della quale è possibile differenziare i *Betanodavirus* nei 4 genotipi virali e con i primers S6-S7 (Ciulli *et al.*, 2005) per l'amplificazione dell'intera porzione codificante della proteina del capsido. L'amplificazione del cDNA è stata eseguita con MasterTaq (Eppendorf[®], Germania). Per 15 ceppi i prodotti della PCR sono stati purificati con High Pure PCR Product Purification Kit (Roche, Germania) e sequenziati con sequenziatore automatico ABI 377 (Applied Biosystem, CA). Le sequenze ottenute sono state allineate e comparate usando il metodo Clustal W (Thompson *et al.*, 1994) del software Megalign (Lasergene Biocomputing DNASTAR Inc., Madison, USA) con sequenze disponibili su GenBank. L'analisi filogenetica è stata condotta con i programmi PHYLIP, versione 3.6 (Felsenstein, 2001) e Tree-Puzzle versione 5.0 (Strimmer & von Haeseler, 1996). La distanza filogenetica è stata calcolata usando il modello di sostituzione F84 e l'albero filogenetico è stato costruito con il metodo Neighbour-joining. Al fine di valutare l'attendibilità dell'analisi filogenetica è stato eseguito il test di bootstrap con 1000 ripetizioni. In un primo momento le sequenze sono state comparate con sequenze dei ceppi di riferimento dei 4 genotipi virali (Nishizawa *et al.*, 1997) al fine di identificare il genotipo di appartenenza. Successivamente, per valutare le correlazioni filogenetiche presenti fra ceppi provenienti da soggetti domestici e selvatici, i ceppi da noi analizzati sono stati confrontati con sequenze di ceppi isolati da branzini allevati nel Mediterraneo durante focolai di Encefalo-Retinopatia Virale (Dalla Valle *et al.*, 2001; Skliris, 2001; Thiéry *et al.*, 2004; Ciulli *et al.*, 2005) e con sequenze di isolati provenienti da varie specie ittiche evidenziati in altre aree geografiche (Nishizawa *et al.*, 1995; Hedge *et al.*, 2002; Chi *et al.*, 2003; Hedge *et al.*, 2003).

Per i ceppi, nei quali sono state evidenziate differenze nucleotidiche, sono state predette le sequenze aminoacidiche e sottoposte ad analisi antigenica tramite il metodo di Jameson-Wolf (Jameson & Wolf, 1988) e gli algoritmi AMPHI e SETTE (Margalit *et al.*, 1987; Sette *et al.*, 1989) implementati nel programma Protean (DNASTAR, Lasergene, USA).

RISULTATI

Per 31 dei 73 campioni (Tabella 2) è stato possibile evidenziare un effetto citopatico che consisteva in una parziale o completa distruzione del monostrato cellulare, caratterizzato dalla comparsa di cellule sottili, rotondeggianti, rifrangenti e granulari con vacuoli intracitoplasmatici (Figura 2).

Nome campione	Specie d'origine	N° campioni	Sequenziati
It/24561/Gn	<i>Gobius niger</i>	9 (a-i)	3
It/2374/Gn	<i>Gobius niger</i>	8 (a-h)	4
It/24559/Mb	<i>Mullus barbatus barbatus</i>	5 (a-e)	3
It/5188/Mb	<i>Mullus barbatus barbatus</i>	2 (a-b)	1
It/70477Pe	<i>Pagellus erythrinus</i>	1	1
It/24561/Sp	<i>Sardina pilchardus</i>	5 (a-e)	2
It/70758/Mb	<i>Trisopterus minutus</i>	1	1

Tabella 2 - Nella tabella sono indicati i campioni risultati positivi alla ricerca di Nodavirus.
 Table 2 - The table shows the samples positive to Nodavirus.



Figura 2 – Effetto citopatico, caratteristico di Nodavirus, osservato per i campioni con esito positivo.
 Figure 2 - Cytopathic effect, characteristic of Nodavirus, observed in positive cell cultures.

L'amplificazione genica tramite RT-PCR, è stata possibile con entrambe le coppie di primers per tutti i ceppi isolati ottenendo rispettivamente una banda di 427 bp e 1014 bp, per i 15 ceppi sequenziati è, inoltre stato ottenuto una sequenza di 987 basi, corrispondente al 97,3% dell'intero gene della proteina del capsido.

Dal sequenziamento ed allineamento delle sequenze nucleotidiche si è evidenziata un'elevata identità genetica fra i ceppi isolati. L'identità nucleotidica e aminoacidica sono risultate comprese fra il 99,8% ed il 100%. In particolare i due campioni isolati da *Sardina pilchardus* hanno mostrato un'identità del 100%, mentre all'interno degli isolati di *Gobius niger* e di *Mullus barbatus* si è osservata rispettivamente un'identità nucleotidica del 99,9-100% e 99,8-100%, dovuta alla sostituzione di 1 o 2 nucleotidi per sequenza e un'identità aminoacidica del 99,9-100% per la sostituzione di 1 residuo aminoacidico. Anche fra campioni di specie diversa è stata evidenziata una completa identità: infatti, i campioni di sardina, pagello, cappellano, 6 dei 7 campioni di ghiozzo e 2 dei 4 campioni di triglia, mostrano un'identità nucleotidica del 100%.

In totale fra i ceppi analizzati sono state evidenziate 3 sostituzioni nucleotidiche in posizione 351, 985 e 992 delle quali 2 codificanti (posizione 985 e 992), entrambe poste all'estremità carbossilica della proteina. Nelle prime due sostituzioni (residui 351 e 985) una adenina (A) viene sostituita con una timina (T), mentre nell'ultima (residuo 992) la T sostituisce la guanina (G) portando ad una variazione della sequenza aminoacidica. In questo caso, il residuo cisteina (Cys) in posizione 331 viene sostituito dal residuo fenilalanina (Phe). L'analisi antigenica di queste due varianti ha evidenziato che questa sostituzione Cys→Phe osservata in un ceppo di *Gobius niger* determina la perdita di un sito legante il complesso maggiore di istocompatibilità (MHC), come rilevato dall'analisi con l'algoritmo SETTE (Figura 3), probabilmente a seguito della variazione delle caratteristiche anfipatiche del filamento conferite dalle caratteristiche biochimiche degli aminoacidi. Dall'allineamento con altre sequenze geniche si evidenzia che questa mutazione è ampiamente presente anche in altri ceppi virali appartenenti a tutti i genotipi e non correlati con quello da noi preso in esame (RGNNV: AY620367; AHNNV: AJ245641; SJNNV: NC-003449) facendo sospettare che possa essere l'esito della pressione selettiva che induce il virus a modificarsi a vantaggio del fitness virale. La perdita di un sito di interazione con il sistema immunitario potrebbe, infatti, conferire al virus maggiori possibilità di sopravvivenza nell'ospite.

La sostituzione al nucleotide 985, invece, porta ad una sostituzione aminoacidica treonina (Thr) con serina (Ser) al residuo 297 che lascia inalterate le caratteristiche di idrofobicità ed antigenicità della proteina.

Dall'allineamento delle sequenze ottenute con i ceppi di referenza, tutti i virus da noi isolati sono stati attribuiti al genotipo RGNNV dimostrando un'identità superiore al 99,2%, mentre le percentuali di identità con ceppi appartenenti ad altri genotipi hanno dato sempre valori di identità inferiori all'83,1%.

Dal confronto delle sequenze con ceppi isolati da branzini nel Mediterraneo durante focolai di Encefalo-Retinopatia Virale l'identità nucleotidica è risultata variare dal 95,2% al 100% di identità, mentre l'identità osservata con ceppi appartenenti al genotipo RGNNV, ma isolati in aree geografiche diverse dal Mediterraneo, è risultata variare dall'84,4% al 99,3%. Dall'allineamento con ceppi identificati in specie diverse dal branzino nel Mediterraneo, inoltre, l'identità nucleotidica variava dal 92,6% al 99,9% evidenziando una maggiore conservazione dei ceppi presenti nel Mediterraneo indipendentemente dalla specie di appartenenza.

L'analisi filogenetica effettuata con i ceppi di referenza e con molteplici ceppi del genotipo RGNNV isolati sia nel Mediterraneo che in altre aree geografiche mostra la formazione di 4 cluster sulla base del genotipo virale (Figura 4). All'interno del genotipo RGNNV si formano una serie di sotto-cluster, ma, ad eccezione di un gruppo di isolati francesi (Thiéry *et al.*, 2004), non si può evidenziare nessun raggruppamento che rispecchi il luogo di provenienza. In particolare, nonostante la maggiore omogeneità osservata fra i ceppi del Mediterraneo rispetto a quelli provenienti da altre aree geografiche non è possibile

evidenziare cluster omnicomprensivi dei virus isolati solo nel Mediterraneo, né è possibile effettuare tale raggruppamento per i ceppi provenienti da altre aree geografiche.

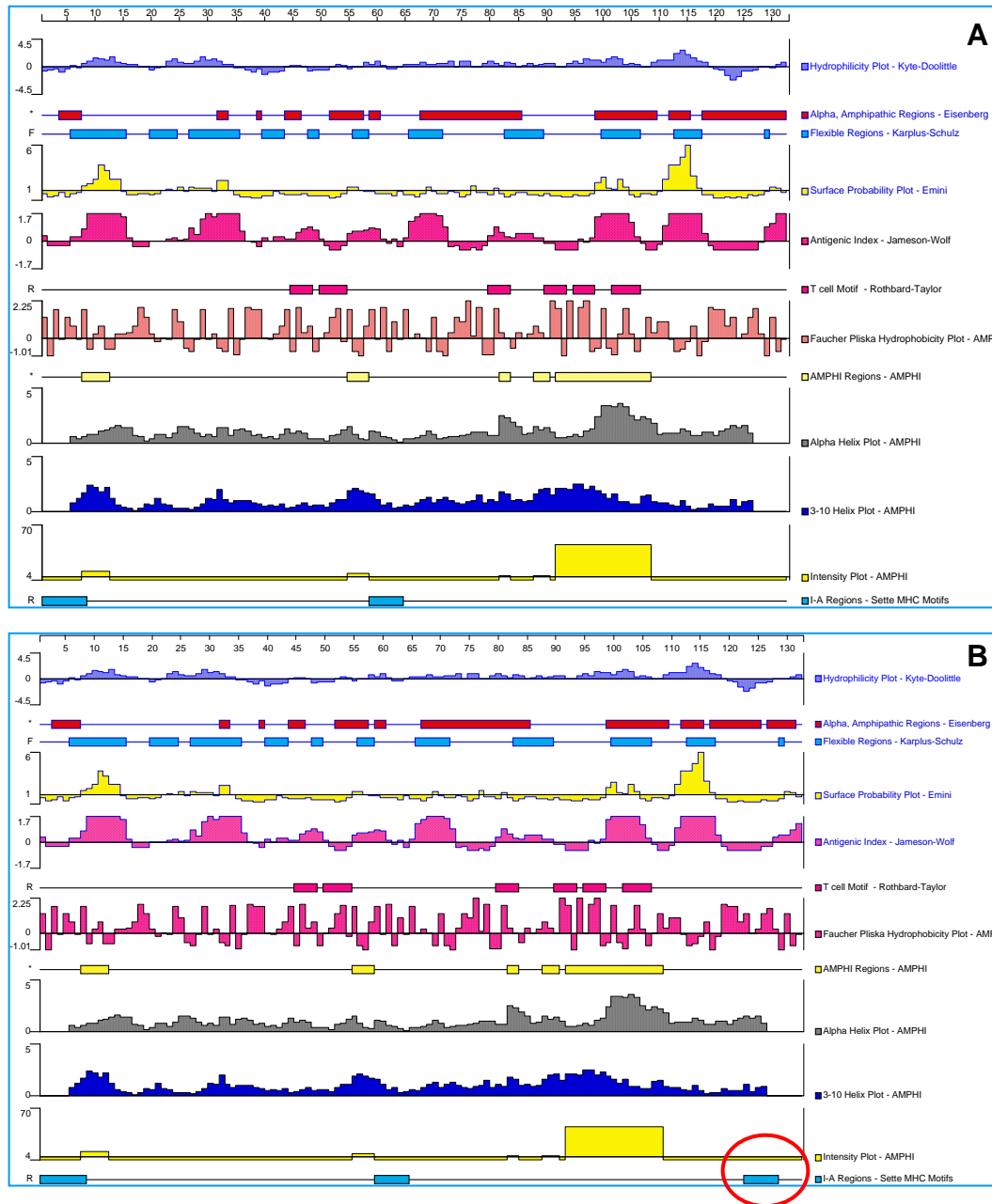


Figura 3 - Analisi antigenica dei ceppi It/2374-e/Gn (A) e It/24559-b/Mb (B). Si evidenzia la mancanza di un dominio legante gli MHC nella porzione carbossilica del ceppo It/2374-e/Gn.
 Figure 3 - Antigenic analysis of It/2374-e/Gn (A) and It/24559-b/Mb (B) strains. We underlined the absence of a MHC bindin domain in It/2374-e/Gn strain.



Figura 4 - Analisi filogenetica della regione T4 degli isolati di *Betanodavirus*. Gli isolati analizzati in questo lavoro sono indicati in grassetto. Le altre sequenze sono state prelevate dal database Genbank o precedentemente pubblicate (Nishizawa *et al.*, 1995; Iwamoto *et al.*, 1999; Grotmol *et al.*, 2000; Dalla Valle *et al.*, 2001; Lai *et al.*, 2001; Lin *et al.*, 2001; Skliris *et al.*, 2001; Ciulli *et al.*, 2002; Hedge *et al.*, 2002; Johnson *et al.*, 2002; Chi *et al.*, 2003; Hedge *et al.*, 2003; Thiéry *et al.*, 2004; Ucko *et al.*, 2004; Ciulli *et al.*, 2005).

I principali valori di bootstrap sono indicati.

Figure 4 - Phylogenetic analysis of T4 region of *Betanodavirus* isolates. Strains sequenced in this work are labeled in bold print. Sequences for other strains were acquired from the GenBank database or previously published (Nishizawa *et al.*, 1995; Iwamoto *et al.*, 1999; Grotmol *et al.*, 2000; Dalla Valle *et al.*, 2001; Lai *et al.*, 2001; Lin *et al.*, 2001; Skliris *et al.*, 2001; Ciulli *et al.*, 2002; Hedge *et al.*, 2002; Johnson *et al.*, 2002; Chi *et al.*, 2003; Hedge *et al.*, 2003; Thiéry *et al.*, 2004; Ucko *et al.*, 2004; Ciulli *et al.*, 2005).

Main bootstrap values are shown.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

L'infezione da *Betanodavirus* è responsabile di ingenti perdite nell'allevamento di varie specie ittiche marine. In Italia e nel Bacino del Mediterraneo la specie maggiormente colpita è il branzino Europeo (*Dicentrarchus labrax*). Recenti studi hanno evidenziato che questa infezione è diffusa anche in soggetti selvatici, in particolare essa è stata evidenziata in Canada, Giappone e Tahiti (Barker *et al.*, 2002; Gagné *et al.*, 2004; Gomez *et al.*, 2004; Thiéry *et al.*, 2004). I soggetti esaminati erano apparentemente sani e quindi è stato ipotizzato per loro il ruolo di portatori sani. La malattia causata da questo virus denominata Encefalo-Retinopatia Virale, viene invece frequentemente osservata in allevamento dove all'infezione si sommano i fattori stressanti dai quali la malattia è molto probabilmente condizionata. La trasmissione orizzontale di questa malattia è stata ampiamente dimostrata e l'evidenziazione di ceppi ad elevata omologia in specie ittiche diverse è documentata e confermata con prove sperimentali soprattutto nell'ambito di ceppi appartenenti al genotipo RGNNV (Castric *et al.*, 2001); questo genotipo, infatti non ha manifestato una particolare specie-specificità, quanto piuttosto un generico adattamento alle specie di acqua calda. In base a tali presupposti diventa fondamentale investigare l'eventuale diffusione di *Betanodavirus* anche nella popolazione ittica selvatica del Mediterraneo, sia per valutarne l'eventuale ruolo di portatori sani, sia al fine di monitorare un eventuale serbatoio naturale di virus. A seguito dell'evidenziazione dei virus nei soggetti selvatici diventa inoltre fondamentale la loro caratterizzazione e comparazione con ceppi responsabili di malattia negli allevamenti. A tal fine risulta molto utile la caratterizzazione genetica, un veloce e pratico metodo di comparazione dei ceppi virali.

Con questa indagine si è evidenziato la presenza d'infezione da *Betanodavirus* in popolazioni selvatiche di specie nelle quali, nella maggior parte dei casi, non era mai stata segnalata. Le specie trovate positive sono *Gobius niger*, *Mullus barbatus barbatus*, *Pagellus erythrinus*, *Sardina pilchardus* e *Trisopterus minutus capelanus*. I ceppi evidenziati e caratterizzati geneticamente hanno mostrato una elevatissima identità nucleotidica fra di loro indipendentemente dalla specie di origine evidenziando una bassa specie-specificità, come precedentemente evidenziato in altre indagini (Gagné *et al.*, 2004; Gomez *et al.*, 2004).

Inoltre, la comparazione dei ceppi isolati da selvatici con virus precedentemente isolati durante focolai di Encefalo-Retinopatia Virale da branzini allevati evidenzia che gli stessi ceppi possono circolare nelle due popolazioni ittiche. Resta comunque da stabilire se l'infezione nei soggetti di allevamento possa essere originata da contatti con pesci selvatici, oppure viceversa.

I ceppi isolati sono stati, inoltre, comparati con ceppi appartenenti allo stesso genotipo e provenienti da altri Paesi mostrando che non è possibile evidenziare raggruppamenti specifici per territorio. Sulla base dell'analisi filogenetica, infatti, i ceppi appartenenti al genotipo RGNNV vengono inclusi in un unico grande cluster indipendentemente dalla loro origine geografica.

L'origine di questa "promiscuità" genetica è ancora sconosciuta e potrebbe essere imputata a vari fattori. I continui scambi di materiale ittico allevato nei due ambienti, infatti, potrebbero essere la causa del passaggio di materiale infetto nei due habitat. L'elevata identità osservata fra i ceppi mediterranei e asiatici, comunque, potrebbe anche essere il risultato di una mancata pressione selettiva nei due ambienti che spinga i virus a differenziarsi. Un monitoraggio genetico protratto nel tempo potrà dare informazioni e portare chiarezza su questo importante quesito.

BIBLIOGRAFIA

- 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 e Shneider). *J. Fish Dis.*, 16: 461-469.
- Barker D.E., MacKinnon A.M., Boston L., Burt M.D., 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.
- 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.
- 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: 1125-1137.
- Ciulli S., Florio D., Scagliarini A. & Prosperi S. (2002). Analisi del gene della proteina del capsid in *Nodavirus* proveniente da un cefalo (*Liza ramada*) di allevamento. *Boll. Soc. It. Patol. Ittica*, 34: 14-22.
- Ciulli S., Natale A., Battilani M., Galletti E. & Prosperi S. (2005). Genetic characterisation of coat protein gene of *Betanodavirus* isolates from different fish species. *Vet. Res. Commun.*, 29, Suppl. 2: 237-240.
- Dalla Valle L., Negrisolo E., Paternello 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.
- Fauquet C.M., Mayo M.A., Maniloff J., Desselberger U. & Ball L.A. (2005). Virus taxonomy, classification and nomenclature of viruses. *Eighth ICTV Report, Academic Press, San Diego, California, USA*.
- Felsenstein J. (2001). Phylogenetic inference package 3.6 (alpha3). *Distribuito dall'autore. Dipartimento di genetica, Università di Washington, Seattle, WA*.
- Frerichs G.N., Rodger H.D. & Peric Z. (1996). Cell culture isolation of piscine neurophaty nodavirus from juvenile sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *J. Gen. Virol.*, 77: 2067-2071.
- Gagné 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.
- Gomez D.K., Sato J., Mushiaki K., Isshiki T., Okinaka 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., Nerland A.H., Biering E., Totland G.K. & Nishizawa T. (2000). Characterization 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.
- Hedge A., Chen C.L., Qin Q.W., Lam T.J. & Sin Y.M. (2002). Characterization, pathogenicity and neutralization studies of a nervous necrosis virus isolated from grouper, *Epinephelus tauvina*, in Singapore. *Aquaculture*, 213: 55-72.

- Hedge A., Teh H.C., Lam T.J. & Sin Y.M. (2003). Nodavirus infection in freshwater ornamental fish, guppy, *Poicelia reticulata* - comparative characterization and pathogenicity studies. *Arch. Virol.*, 148: 575-586.
- 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.
- Jameson B.A. & Wolf H. (1988). The antigenic index: a novel algorithm for predicting antigenic determinants. *CABIOS*, 4: 181-186.
- Johnson S.C., Sperker S.A., Leggiadro C.T., Groman D., Ritchie R.J., Cook M.D. & Cusack R. (2002). Identification and characterization of a piscine neuropathy and nodavirus from juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*). *J. Aquat. Anim. Health*, 14: 124-133.
- Lai Y.S., Murali S., Chiu H.C., Ju H.Y., Lin Y.S., Chen S.C., Guo I.C., Fang K.E. & Chang C.Y. (2001). 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., Abela M. & Brinck-Iversen J. (1997). Viral Nervous Necrosis of seabass *Dicentrarchus labrax* L.: epidemiological data and prophylactic guidelines. *Abstracts book, VIIIth International Conference "Diseases of Fish and Shellfish". EAFP, Edinburgh, 14-19 September: 50.*
- Lin C.S., Lu M.W., Tang L., Liu W., Chao C.B., Lin C.J., Krishna N.K., Johnson J.E. & Schneemann A. (2001). Characterization of virus-like particles assembled in a recombinant baculovirus system expressing the capsid protein of a fish nodavirus. *Virology*, 290: 50-58.
- Munday B.L., Kwang J. & Moody N. (2002). Betanodavirus infections of teleost fish: a review. *J. Fish Dis.*, 25: 127-142.
- Margalit H., Spouge J.L., Cornette J.L., Cease K.B., Delisi C. & Berzofsky J.A. (1987). Prediction of immunodominant helper T cell antigenic sites from the primary sequence. *J. Immunol.*, 138: 2213-2229.
- 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: 1633-1636.
- Nishizawa T., Mori K., Furuhashi M., Nakai T., Furusawa I. & Muroga K. (1995) Comparison of coat protein genes of five *Nodavirus*, the causative agents of viral nervous necrosis in marine fish. *J. Gen. Virol.*, 76: 1563-1569.
- Péducasse S., Castric J., Thiéry 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.
- Sette A., Buus S., Appella E., Smith J.A., Chesnut R., Miles C., Colon S.M. & Grey H.M. (1989). Prediction of major histocompatibility complex binding regions of protein antigens by sequence pattern analysis. *Proc. Nat. Acad. Scien.*, 86: 3296-3300.
- 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.

Strimmer K. & von Haeseler A. (1996). Quartet puzzling: a quartet maximum-likelihood method for reconstructing tree topologies. *Mol. Biol. Evol.*, 13: 964-969.

Thiéry R., Cozien J., De Boisséson C., Kerbart-Boscher S. & Névarez 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.

Thompson J.D., Higgins D.G. & Gibson T.J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, 22: 4673-4680.

Ucko M., Colomi A. & Diamant A. (2004). Nodavirus infections in Israeli mariculture. *J. Fish Dis.*, 27: 459-469.