

PREMIO TESI “S.I.P.I. 2006”

**Indagine sull’infezione da *Betanodavirus*
in specie ittiche selvatiche**

Investigation on Betanodavirus infection in wild fish species

Marco Grodzki, Elena Galletti, Sara Ciulli

Corso di Laurea in Acquacoltura ed Ittiopatologia, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Bologna,
Sede di Cesenatico, viale Vespucci, 2 – 47042 Cesenatico (FC), Italy

SUMMARY – *Betanodavirus* infection has a cosmopolitan distribution and causes a pathology defined Viral Nervous Necrosis or Viral Encephalo-Retinopathy responsible of high mortality in several farmed marine fish species with consequent high economical losses. Betanodaviruses are little ssRNA virus classified in Nodaviridae family and divided in 4 species. The infection has been also signalled in wild fish, so it is important to inquire on their possible role in the epidemiological cycle. The aim of this study was to investigate the presence of *Betanodavirus* infections in wild fish of the Middle Adriatic Sea and to characterize genetically the isolated viral strains. Brain samples from 293 fish belonging to 22 different species were collected at the fish market of Cesenatico. Samples were pooled and analyzed for *Betanodavirus* infection with virus isolation on the cell line SSN-1. Where specific cytopathic effect was visualised *Betanodavirus* infection was confirmed by RT-PCR analysis. Genetic characterization of viruses isolated was conducted by sequencing and phylogenetic analysis. Thirteen samples from 10 different species resulted positive. Sequencing and phylogenetic analysis confirmed that the isolated viruses belong to the RGNNV genotype and evidenced a high grade of similarity with strains previously isolated from farmed fish.

Key words: *Betanodavirus*, Marine fish, Middle Adriatic Sea, Phylogenetic analysis, RT-PCR, RGNNV .

INTRODUZIONE

I *Betanodavirus* sono virus appartenenti alla famiglia Nodaviridae, capaci di infettare i pesci responsabili di una patologia definita Encefalo-Retinopatia Virale (ERV) o Necrosi Nervosa Virale. Questa malattia ha una distribuzione cosmopolita ed è responsabile di elevata mortalità in larve e stadi giovanili di varie specie ittiche marine d'allevamento con conseguenti elevate perdite economiche (Munday *et al.*, 2002).

I *Betanodavirus* sono piccoli virus, a simmetria icosaedrica, privi di envelope e il loro genoma è composto da 2 molecole di RNA a polarità positiva. La molecola RNA1 del peso di 3,1 kbp è responsabile della sintesi della RNA-polimerasi RNA-dipendente, mentre la molecola RNA2 del peso di 1,4 kbp sintetizza la proteina del capsido virale. Sulla base dell'analisi del genoma è stato possibile suddividere il genere *Betanodavirus* in 4 genotipi recentemente riconosciuti dalla tassonomia ufficiale come 4 specie: SJNNV (Striped Jack Nervous Necrosis Virus), BFNNV (Barfin Flounder Nervous Necrosis Virus), TPNNV (Tiger Puffer Nervous Necrosis Virus) e RGNNV (Redspotted Grouper Nervous Necrosis Virus) (Nishizawa *et al.*, 1997; Fauquet *et al.*, 2005).

Dal 1995 l'ERV è stata segnalata anche in Italia dove la specie maggiormente colpita è

costituita dal branzino (*Dicentrarchus labrax*). Al momento si presume che le specie recettive, a livello mondiale, siano oltre 40. L'elenco comprende molte specie marine provenienti da paesi con acque sia calde che fredde e anche alcune specie di acqua dolce.

L'infezione è stata segnalata anche nei soggetti selvatici ed il loro ruolo è intensamente studiato sia con prove sperimentali, sia con studi di biologia molecolare al fine di caratterizzare e comparare i ceppi isolati da soggetti selvatici e da soggetti d'allevamento (Gagné *et al.*, 2004; Gomez *et al.*, 2004).

Il virus si trasmette sia attraverso il contatto diretto, sia mediante l'acqua, attrezzature e mangime fresco. Un importantissimo ruolo nella diffusione del patogeno è rivestito dai riproduttori; infatti, in alcune specie è possibile anche la trasmissione verticale.

La sintomatologia specifica è prevalentemente nervosa: nuoto circolare o a spirale, improvvisi scatti alternati a letargia, posizione verticale. La malattia è caratterizzata da lesioni istopatologiche quali vacuolizzazione dei neuroni, della materia grigia dell'encefalo e della retina e la necrosi del Sistema Nervoso Centrale.

L'ERV può essere diagnosticata attraverso la dimostrazione delle caratteristiche lesioni nell'encefalo e/o nella retina tramite la microscopia ottica, attraverso la rilevazione dei virioni, antigeni virali o nucleotidi virali nel campione, oppure tramite l'evidenziazione di anticorpi specifici nel siero o nei fluidi corporei.

Non essendo ancora disponibili metodi terapeutici o vaccinali per limitare la malattia, bisogna ricorrere alla profilassi diretta tramite il controllo dell'ambiente e la diagnosi precoce. A tal fine si rende indispensabile ampliare le conoscenze su alcuni aspetti epidemiologici e diagnostici della malattia. In particolare è necessario indagare la presenza dell'infezione nei soggetti selvatici ed il loro possibile ruolo nel ciclo epidemiologico.

MATERIALI E METODI

Per questa indagine, sono stati analizzati campioni di encefalo prelevati da pesci selvatici appartenenti a 22 specie ittiche marine reperite presso il Mercato Ittico di Cesenatico (FC). Il pescato proveniva dalla zona di pesca compresa tra Rimini e Ravenna. I campionamenti sono stati effettuati settimanalmente dal 25 maggio al 6 dicembre 2005 con un'interruzione dal 6 luglio al 15 settembre a causa del fermo pesca. La quantità di pesci prelevati ad ogni singolo campionamento è stata variabile, da un massimo di 33 pesci ad un minimo di 4 pesci con una media di 16,27 pesci a campionamento; in totale sono stati raccolti 293 pesci. Le specie campionate sono le seguenti (il numero di pesci prelevati di ogni specie viene indicato fra parentesi): alice/acciuga (19), pagro (4), orata (4), sogliola (4), passera (2), aguglia (1), ombrina (1), mormora (1), pesce prete (1), alaccia (3), ghiozzo (66), cefalo (18), triglia di fango (39), boga (17), mazzola/gallinella (27), merlano/molo (21), suro (13), sarda/sardina (14), sarago/sparo (8), suacia/zanchetta (12), sgombro (10) e nasello (8). I pesci sono stati processati come pool di più esemplari omogenei per specie e giornata di prelievo.

I campioni di encefalo sono stati omogenati, decontaminati con soluzione antibiotata e quindi processato per l'isolamento virale su SSN-1 (Figura 1) (Frerichs *et al.*, 1996). Ogni campione è stato processato sia tal quale, sia con una diluizione 1:10. La coltura cellulare è stata quindi osservata giornalmente fino alla comparsa dell'effetto citopatico (ECP) oppure per almeno 15 giorni in assenza di comparsa dello stesso. Sia in presenza sia in assenza di ECP per ciascun campione sono state effettuate 2 subcolture con surnatante cellulare 7 giorni post infezione. I lisati cellulari dei campioni che hanno manifestato l'effetto citopatico sono stati quindi processati per l'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 S6-S7 (Ciulli *et al.*, 2005a; 2005b) per l'amplificazione dell'intera porzione codificante della proteina del capsido. L'amplificazione del cDNA è stata eseguita con MasterTaq (Eppendorf[®], Germania).

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 programma Clustal W (Thompson *et al.*, 1994) del software Lasargene Biocomputing (DNASTAR Inc. Madison, USA) con sequenze disponibili su GenBank. L'analisi filogenetica è stata condotta con il programma MEGA versione 2.1 (Kumar *et al.*, 2004). La distanza filogenetica è stata calcolata usando il metodo Jukes-Cantor e l'albero filogenetico è stato costruito seguendo il metodo Neighbour-joining. Al fine di valutare l'attendibilità dell'analisi filogenetica è stato eseguito il test di bootstrap 1000 ripetizioni.

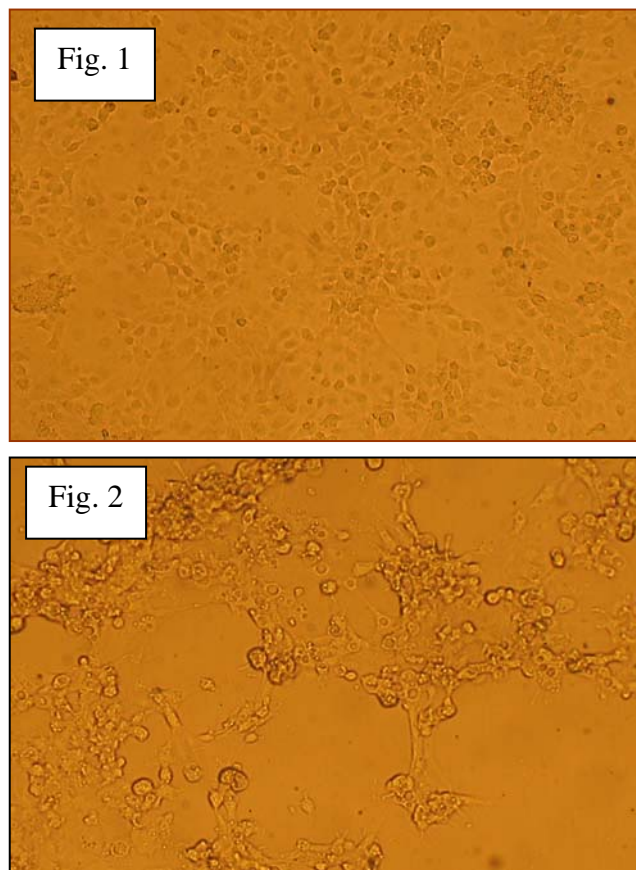


Figura 1 – Monostrato cellulare della linea SSN-1.

Figura 2 – Monostrato cellulare con effetto citopatico da *Betanodavirus*.

Figure 1 –SSN-1 cell line monolayer.

Figure 2 – Cytopathic effect by Betanodavirus.in SSN-1 cell line monolayer.

RISULTATI

Tredici campioni hanno dato esito positivo in coltura cellulare. I campioni di suro e di aguglia hanno manifestato effetto citopatico al 2° passaggio, 7 giorni post infezione, mentre negli altri casi è stato possibile evidenziare l'effetto citopatico tipico al terzo passaggio generalmente dopo 2-5 giorni di infezione (Figura 2). La RT-PCR ha confermato per tutti i campioni isolati la presenza di *Betanodavirus*.

Nella tabella 1 sono riportate le specie, il numero di soggetti per campione e la data di raccolta dei campioni positivi per *Betanodavirus*.

Dieci specie ittiche sono risultate colpite dall'infezione, 4 (cefalo, sardina, triglia, ghiozzo) delle quali erano già state precedentemente segnalate sensibili all'infezione e trovate infette in precedenti indagini svolte su soggetti di allevamento o selvatici (Guercio *et al.*, 2005). Sei specie (suro, mazzola/gallinella, aguglia, molo, nasello, boga), invece, non erano mai state segnalate come sensibili, né sono riportate indagini in soggetti di tale specie.

Calcolando la percentuale di campioni positivi per specie, mazzola/gallinella è risultata la specie più frequentemente colpita dall'infezione (30%), a seguire erano interessati il 28,6% dei ghiozzi, il 25% delle sarde e naselli, il 18,2% dei cefali, il 14,3% dei suri, il 12,5% dei merlani ed il 9,1% delle triglie. Il campione di aguglia risultato positivo era l'unico disponibile per quella specie. In totale l'11,9% dei campioni è risultato positivo all'infezione evidenziando una elevata diffusione dell'infezione in soggetti selvatici.

Otto ceppi dei 13 isolati sono stati sequenziati (Tabella 1) ed è stato ottenuto un frammento di 362 bp comprendente la regione variabile dell'RNA2 del genoma virale.

Specie di provenienza		N° soggetti	Data di campionamento	Sequenza SI/NO
Nome comune	Nome scientifico			
Cefalo	<i>Mugil cephalus</i>	3	8 giugno	NO
Cefalo	<i>Mugil cephalus</i>	1	29 giugno	SI
Suro	<i>Trachurus spp.</i>	4	15 settembre	SI
Mazzola/Gallinella	<i>Trigla lucerna</i>	4	21 settembre	NO
Sardina	<i>Sardina pilchardus</i>	4	21 settembre	SI
Aguglia	<i>Belone belone</i>	1	2 ottobre	SI
Triglia	<i>Mullus barbatus</i>	1	18 ottobre	NO
Merlano/ Molo	<i>Merlangius merlangus merlangus</i>	2	25 ottobre	NO
Mazzola/Gallinella	<i>Trigla lucerna</i>	2	8 novembre	SI
Nasello	<i>Merluccius merluccius</i>	2	16 novembre	SI
Ghiozzo	<i>Gobius sp.</i>	3	16 novembre	SI
Boga	<i>Boops boops</i>	1	16 novembre	SI
Mazzola/Gallinella	<i>Trigla lucerna</i>	1	16 novembre	NO

Tabella 1 - Specie, numero di soggetti per campione e la data di raccolta dei campioni positivi per *Betanodavirus*.
Table 1 – The fish species, the number of subjects and sampling dates for *Betanodavirus* positive samples are reported.

Le sequenze ottenute sono state comparate con i ceppi di referenza e sulla base dell'identità nucleotidica e dell'analisi filogenetica attribuite al genotipo RGNNV (Figura 3).

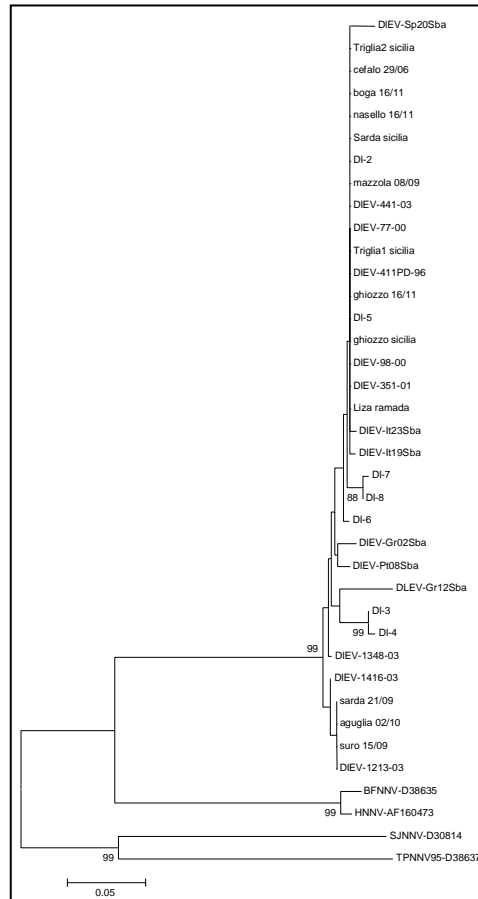


Figura 3 – Analisi filogenetica dei campioni positivi.
 Figure 3 – Phylogenetic analysis of positive samples.

Sulla base dell'analisi filogenetica i ceppi analizzati si dividono in 2 cluster con il 100% di identità nucleotidica all'interno del gruppo e il 98,2% di identità fra i due gruppi evidenziando la circolazione di due ceppi virali diversi. Comparando i ceppi analizzati con sequenze di ceppi isolati in focolai di ERV da branzino Europeo nel Mediterraneo e di ceppi isolati da specie selvatiche in una precedente indagine effettuata sul pescato del Canale di Sicilia (Sicilia) si osserva ancora la divisione in due gruppi. In entrambi i gruppi sono comunque presenti sia ceppi isolati da branzino, sia ceppi isolati da selvatici. L'identità nucleotidica fra ceppi selvatici e domestici varia dal 92,5 al 100% mostrando la circolazione degli stessi ceppi virali in allevamento e nelle popolazioni selvatiche. Non si osserva invece correlazione tra i raggruppamenti e la specie ospite di provenienza; infatti un ceppo isolato da sarda in un precedente studio è diverso (98,2% identità nucleotidica) da quello isolato in questo studio. I ceppi, invece, di cefalo, mazzola/gallinella e nasello mostrano una elevata similarità con i ceppi isolati da pesci selvatici pescati nel canale di Sicilia, avendo una identità nucleotidica del 99,7-100%.

DISCUSSIONI E CONCLUSIONI

L'infezione da *Betanodavirus* è stata segnalata per la prima volta alla fine degli anni '80. In poco tempo questa infezione ha assunto una distribuzione cosmopolita interessando un numero crescente di specie ittiche. La malattia che i *Betanodavirus* determinano viene comunemente evidenziata negli allevamenti dove le condizioni di stress ed elevata densità di popolazione incrementano la suscettibilità della specie ospite al virus. Recenti studi comunque evidenziano che l'infezione è diffusa anche fra i selvatici, dove solo molto raramente è stata osservata qualche forma clinica.

Con questa indagine si è voluto contribuire alla conoscenza della diffusione dell'infezione da *Betanodavirus* nelle specie ittiche selvatiche che comunemente vivono nel Medio Adriatico. L'indagine ha permesso di evidenziare l'infezione in 6 nuove specie fino ad oggi mai segnalate come infette da *Betanodavirus* e in soggetti di 4 altre specie precedentemente segnalate come infette, ma in altre aree geografiche.

Il virus è risultato diffuso sia in specie stanziali che in specie pelagiche (aguglia, sardina e boga) che possono facilmente entrare in contatto con soggetti di allevamento.

Le positività ottenute, in relazione ai tempi di campionamento evidenziano una maggiore circolazione del virus nel periodo settembre-ottobre, facendo pensare che essa sia il risultato dell'amplificazione virale che avviene durante i focolai estivi negli allevamenti.

Il sequenziamento e l'analisi filogenetica hanno evidenziato che si tratta di *Betanodavirus* genotipo RGNNV e che i ceppi circolanti nei selvatici hanno un alto grado d'identità con i ceppi isolati da soggetti allevati, facendo ipotizzare un probabile ed allarmante ruolo di portatori asintomatici dei soggetti selvatici di queste specie ittiche. Deve comunque essere ancora chiarito se l'infezione in queste specie selvatiche sia una possibile sorgente dell'infezione negli allevamenti o se si tratta solo della conseguenza della massiva amplificazione virale che avviene durante i focolai stessi. Il coinvolgimento di specie pelagiche capaci di spostarsi in un ampio territorio le rende comunque una possibile via di trasmissione e diffusione del virus da un allevamento ad un altro e pertanto la conoscenza ed il monitoraggio delle specie recettive è fondamentale al fine di controllare l'infezione.

BIBLIOGRAFIA

Ciulli S., Galletti E., Vaccari F., Prosperi S. (2005a) Evidenziazione e quantificazione di *Betanodavirus* con REAL TIME PCR. *Atti LIX Convegno Nazionale Società Italiana delle Scienze Veterinarie, Viareggio, 21-24 settembre 2005*: 173.

Ciulli S., Natale A., Cannella V., Purpari G., Di Marco P., Ferrantelli V., Castiglione F., Scagliarini A. & Guercio A. (2005b). Evidenziazione dell'infezione da *Betanodavirus* in specie ittiche selvatiche in Sicilia. *Atti del XII Convegno nazionale Società Italiana di Patologia Ittica. Cesenatico 29 settembre-1 ottobre 2005*: 2.

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*.

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., Mushiake 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.

Guercio A., Cannella V., Ciulli S., Purpari G., Di Marco P., Ferrantelli V., Castiglione F., Galletti E. & Scagliarini A. (2004). Diagnosis of *Betanodavirus* infection in wild fish species from Sicily. *5th National Congress of the Italian Society of Virology Orvieto, 19-21 settembre, 2005*: 64.

Kumar S., Tamura K. & Nei M. (2004). MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics*, 5: 150-163.

Munday B.L., Kwang J. & Moody N. (2002). *Betanodavirus* infections of teleost fish: a review. *J. Fish Dis.*, 25: 127-142.

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.

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.