

Messa a punto di saggi sierologici per la valutazione di anticorpi verso il Nodavirus della Encefaloretinopatia del branzino (*Dicentrarchus labrax*)

*Set-up of serological assays for the evaluation of antibodies against the Nodavirus of the sea-bass (*Dicentrarchus labrax*) encephalo-retinopathy*

Nicola De Simone^{1*}, Belen Borrego², Giovanni Loris Alborali²

¹ Biologo libero professionista

² Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, Via Bianchi, 7 – 25124 Brescia

RIASSUNTO – La diagnosi della Encefalo-retinopatia virale (ERV) è attuata correntemente tramite metodi virologici, ma poco esiste sull'impiego diagnostico di saggi sierologici. Scopo di questo lavoro è la valutazione dello stato sanitario di allevamento nei riguardi della ERV tramite saggi sierologici. A tal fine è stato utilizzato l'emosiero di 62 branzini (*Dicentrarchus labrax*) provenienti da un allevamento del Nord Italia. In questo allevamento la ERV era presente in forma sintomatica da alcuni anni con le caratteristiche remissioni nelle stagioni invernali ed esacerbazioni nelle stagioni estive. Il prelievo dei 62 emosieri è stato eseguito nel dicembre 2000 da 42 soggetti di piccola taglia (75 g. circa) e dell'età di 1 anno (Gruppo Giovani) e da 20 soggetti di taglia media (500 g. circa) e dell'età di 3 anni (Gruppo Adulti). Questi ultimi provenivano da due vasche distinte (C5 e C6) ed erano animali sopravvissuti alle epidemie degli anni precedenti. Da questo allevamento, nel 1998 era stato isolato un ceppo virale di Nodavirus (DIEV, *Dicentrarchus labrax* Encephalopathy Virus) da noi utilizzato come ceppo di riferimento per la produzione di sieri policlonali di coniglio e cavia e per la produzione di anticorpi monoclonali. Tali reagenti sono stati usati per la messa a punto di saggi sierologici, due del tipo ELISA "antigen trapping" ed uno del tipo ELISA "competitiva". Infine, allo scopo di dare supporto alla valutazione dei saggi sierologici, sono stati eseguiti esami virologici sui tessuti cerebrali degli stessi 62 animali donatori dell'emosiero.

SUMMARY – *Diagnosis of Viral encephalo-retinopathy (VER) is currently performed by virological methods and little information exists, for the purpose, on the use of serological assays. Aim of this work is to evaluate the farm health-status in regard of VER also through serological assays. The study was performed using blood serum collected from 62 single sea-bass (*Dicentrarchus labrax*) coming from a fish farm of North Italy. This farm was infected in symptomatic form since some years, with characteristic remission or exacerbation depending winter or summer season. Sampling of the 62 blood has been done in December 2000 from 42 small size animals (75 g.) defined "Young Group" and from 20 medium size, (500 g.) animals survived to previous infections, defined "Adult Group", held in two distinct fish-units (C5 and C6). During 1998 a Nodavirus strain (DIEV, *Dicentrarchus labrax* Encephalopathy Virus) has been isolated by us and used as antigen to produce rabbit and guinea-pig polyclonal sera as well as monoclonal antibodies. Such reagents as been used to set up three ELISA assays all based on the use of monoclonal antibodies of which two "trapping ELISA" and one "competitive ELISA". Finally, in order to give additional support to the evaluation of serological assays, the brain tissues of the same 62 fish donors of the blood have been examined with virological methods to ascertain or not the presence of DIEV particles or antigen.*

Key words: Fish Nodavirus, Sea-bass, Viral Encephalo-Retinopathy (VER), Virology, Monoclonal Antibody, ELISA assays, Serology.

* Corresponding Author: c/o Laboratorio di Ittiopatologia, Istituto Zooprofilattico della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, via Bianchi, 7 - 25124 Brescia. Tel.: 030-2290216; Fax: 030-2290552; E-mail: ittiopatologia@bs.izs.it.

INTRODUZIONE

L'agente eziologico dell'Encefalo-retinopatia Virale (ERV) del branzino (*Dicentrarchus labrax* Encephalopathy Virus = DIEV) ha causato gravi danni all'acquacoltura Mediterranea.

La diagnosi di laboratorio della malattia prevede l'impiego dei principali metodi virologici mentre l'accertamento di anticorpi circolanti tramite i metodi tradizionali (es. la sieroneutralizzazione) sono limitati a laboratori specializzati a causa delle notevoli difficoltà tecniche di esecuzione, consumo di tempo e costi elevati.

I risultati di esami sierologici costituiscono però un dato di rilevante importanza per la diagnosi ed il successivo controllo di qualsiasi malattia infettiva e costituiscono un prezioso complemento degli esami virologici.

Gli scopi di questo lavoro sono stati di colmare la lacuna costituita dall'assenza di saggi sierologici eseguibili facilmente in qualsiasi laboratorio per la determinazione di anticorpi circolanti verso il Nodavirus del branzino e di verificare l'importanza delle risultanze sierologiche ai fini di delineare lo stato sanitario d'allevamento nei riguardi della ERV.

L'allevamento preso in considerazione forniva caratteristiche interessanti per gli scopi di questo lavoro costituite da:

- certezza della diffusione progressiva ed in atto della ERV del branzino. La malattia era stata accertata in forma clinica da anni e presente, anche se in grado lieve al momento del prelievo. Sebbene in minima quantità e pur in inverno, persisteva negli animali di piccola taglia la presenza di sintomi sovrapponibili ad ERV unitamente ad una bassa, ma osservabile mortalità;
- questo "status" permetteva l'attribuzione di valutazione di positività o negatività con maggior certezza rispetto a quella ottenibile in allevamenti reputati indenni in un periodo in cui la maggior parte degli allevamenti nazionali di branzino era infetta dal virus;
- la possibilità di poter esaminare soggetti adulti sopravvissuti ad infezioni avvenute due anni prima del prelievo;
- l'opportunità di eseguire esami di anticorpi indotti per infezione di un virus identico o perlomeno dotato di elevata omologia con quello previamente isolato nello stesso allevamento ed utilizzato in seguito come ceppo di riferimento per la preparazione di tutti gli anticorpi diagnostici policlonali e monoclonali.

Al fine di dare maggior supporto ai risultati sierologici, si decideva infine di eseguire uno studio virologico sui tessuti cerebrali degli stessi animali donatori dei sieri esaminati. I risultati in dettaglio dell'esame virologico saranno oggetto di una successiva pubblicazione.

MATERIALI E METODI

Ceppo Virale di riferimento:

Il ceppo virale 5753/1, isolato il 12/08/98 da tessuto cerebrale di branzino mediante inoculazione dell'omogenato su colture cellulari SSN-1 ed amplificato mediante passaggi seriali, è stato utilizzato come antigene per la produzione di sieri policlonali di coniglio e di cavia, per la produzione di anticorpi monoclonali ed inoltre come ceppo virale in tutte le successive prove.

Animali utilizzati e prelievi:

Sono stati utilizzati complessivamente 62 branzini (*D. labrax*) di diversa taglia ed età e precisamente:

- 42 soggetti di taglia piccola (circa 75 g.) e di età di circa 1 anno (Gruppo Giovani).

9 animali di questo gruppo presentavano segni clinici ascrivibili alla malattia. Essi sono stati contrassegnati con la lettera M da 1 a 9;

- 20 soggetti di taglia media (500 g.) e di età di circa 3 anni (Gruppo Adulti).

I pesci del Gruppo Adulti (sopravvissuti alle precedenti epidemie) sono stati prelevati da vasche denominate C5 e C6 tenute separate. Da ognuna erano prelevati 10 animali. Gli animali erano salassati in bianco tramite puntura della vena caudale. Il siero era separato dal coagulo mediante centrifugazione e conservato a -20° C.

Immediatamente dopo il prelievo le carcasse erano congelate e tenute a -70° C; da queste, all'occorrenza, era prelevato il cervello per l'esecuzione degli esami virologici.

Anticorpi diagnostici:

Antigene costituito da DIEV purificato ed emulsionato a FCA, era usato per iperimmunizzare cavie, conigli e topi Balb/c. I sieri iperimmuni policlonali erano raccolti da cavie e conigli mentre gli anticorpi monoclonali erano prodotti dai topi Balb/c iperimmunizzati secondo il protocollo descritto da Brocchi *et al.* (1993).

Saggi sierologici:

Sviluppo di saggi ELISA

Per ciò che riguarda i saggi ELISA utilizzati in sierologia sono state messe a punto ed impiegate complessivamente 3 reazioni immunoenzimatiche, tutte basate sull'impiego di anticorpi monoclonali.

Due saggi sono del tipo "ELISA trapping": la prima basata sul "trapping" dell'antigene virale, la seconda basata sul "trapping" delle immunoglobuline.

Il terzo saggio del tipo "ELISA competitivo", prevedeva l'immunocattura dell'antigene virale da parte di un siero policlonale anti-DIEV, seguito da aggiunta contemporanea di diluizioni del siero in esame e da monoclonale anti-DIEV marcato.

La definizione delle soglie di positività dei tre saggi ELISA è stata determinata utilizzando una banca di sieri di branzino (N=226) da allevamenti con storia nota.

Dettagli sulle caratteristiche degli anticorpi monoclonali e sulla determinazione delle soglie di positività sono riportate da Borrego *et al.* (2001).

ELISA "Antigen trapping"(*)

Le micropiastre erano adsorbite⁽¹⁾ con un siero policlonale di coniglio anti-DIEV⁽²⁾ diluizione 1/20.000. Dopo lavaggio⁽³⁾ si aggiungeva antigene virale⁽⁴⁾ 1/10; l'antigene di controllo era rappresentato da criolisato di cellule SSN-1 alla stessa diluizione. Dopo incubazione⁽⁵⁾ e lavaggio veniva aggiunto il siero di branzino in esame (da 1/100 in base 2) in diluente con siero normale di coniglio 1%. Dopo incubazione e lavaggio era aggiunto l'anticorpo monoclonale anti-Ig di branzino (5C5) coniugato con perossidasi, in diluizione 1/4000. Dopo ulteriore incubazione e lavaggio si leggeva⁽⁶⁾ il risultato. La reazione era considerata positiva per un valore di assorbanza > 0,5 O.D.

(*) Legenda:

- (1) Adsorbimento = L'adsorbimento era attuato diluendo il reagente in tampone Carbonato-Bicarbonato a pH 9,6 ed incubando a +4° C per una notte.
- (2) Volume = Il volume dei reagenti era di 50 µl/pozzetto di micropiastre per saggi ELISA.
- (3) Lavaggio = Aggiunta di 300 µl/pozzetto di PBS-Tween 20 allo 0,05% per 3 minuti, svuotando tramite rovesciamento; il processo è ripetuto 3 volte.
- (4) Antigene Virale = Surnatante di cellule SSN-1 infettato con ceppo virale di referenza e diluito come indicato.
- (5) Incubazione = Lenta rotazione orbitale in termostato a 37° C per 1 ora.
- (6) Lettura = Dopo l'aggiunta del tampone substrato per 10 minuti, seguito da blocco con 2N H₂SO₄, si leggeva la Densità Ottica (DO) a λ = 492 nm.

ELISA “Trapping Immunoglobuline”

L'anticorpo monoclonale anti-Ig di branzino (2G7 a 10 µg/ml) era adsorbito su micropiastre. Dopo lavaggio si aggiungevano diluizioni da 1/100 in base 2 di siero di branzino in esame in diluente con siero normale di coniglio all'1%. Dopo incubazione e lavaggio, erano aggiunti sia l'antigene virale diluito 1/3, sia l'antigene di controllo (criolisato di cellule SSN-1 alla stessa diluizione). Dopo incubazione e lavaggio era aggiunto l'anticorpo monoclonale (1G4 anti-DIEV) coniugato con perossidasi (1/3000). Dopo ulteriore incubazione e lavaggio si leggeva il risultato. La reazione è considerata positiva per un valore di assorbanza > 0,3 O.D.

ELISA “competizione”

Siero policlonale di coniglio anti-DIEV era adsorbito (1/20000). Dopo lavaggio si aggiungeva l'antigene virale 1/100, seguito da incubazione e lavaggio. In seguito si aggiungevano contemporaneamente 25 µl di anticorpo monoclonale (1G4 anti DIEV) coniugato a perossidasi (1/250) e siero del branzino in esame diluito da 1/6 in base 3.

Il controllo della reattività 100% era costituito da diluente (al posto del siero in esame) seguito dal marcato. Dopo incubazione e lavaggio si leggeva il risultato.

Il cut-off era stabilito al 70% di inibizione: erano considerati positivi i sieri che davano un valore di inibizione > dell'80% alla diluizione 1/6.

Saggi virologici:

I materiali usati nei saggi virologici sono stati:

- i tessuti cerebrali tal quali usati per eseguire le impronte sui vetrini per immunofluorescenza;
- l'omogenato dei tessuti cerebrali (10% p/v) eseguito in terreno MEM addizionato di antibiotici;
- il criolisato del III° passaggio di coltura di cellule SSN-1 infettate con l'omogenato.

Prove virologiche dirette:*Immunofluorescenza*

Su vetrini da microscopio si eseguivano tre impronte da tessuto cerebrale, seccate all'aria e fissate in acetone a -20° C per 30'. Sulle tre impronte si facevano reagire per 30' a 37° C, rispettivamente: un siero iperimmune anti-DIEV da coniglio, una miscela di monoclonali anti-DIEV, il tampone PBS. Dopo lavaggio si lasciavano reagire, come sopra, le rispettive anti-Ig di coniglio e di topo marcate con FITC. I preparati erano contrastati in Blue Evans 0,01% ed esaminati in idoneo microscopio.

ELISA “Sandwich” per la ricerca dell'antigene

Si adsorbiva siero policlonale di coniglio anti-DIEV (1/20.000). Dopo lavaggio, si aggiungeva omogenato (10% p/v in PBS) di cervello, oppure il criolisato del III° passaggio di coltura cellulare, in diluizioni base 3 dal non diluito. I controlli negativo e positivo erano rispettivamente il diluente e l'antigene virale 1/10. Dopo lavaggio era aggiunto siero di cavia anti-DIEV (1/5000). Dopo incubazione e lavaggio era aggiunto l'anti-Ig di cavia coniugato con perossidasi (1/1500) in diluente contenente siero normale di coniglio per eliminare background aspecifici. Dopo incubazione e lavaggio, si procedeva alla lettura. La reazione era considerata positiva per un valore >0,6 O.D.

Altre prove virologiche:RT-PCR

L'estrazione dell'RNA da omogenati di materiale cerebrale o del criolisato di coltura cellulare con questo infettata era eseguita secondo il protocollo descritto da Chomzynski *et al.* (1987). La reazione PCR era eseguita secondo il protocollo descritto da De Mas *et al.* (1998).

Isolamento del Virus su colture cellulari

L'omogenato di tessuto cerebrale (10% p/v) era ottenuto per macinazione in mortaio con sabbia di quarzo e terreno MEM contenente antibiotici. Il protocollo seguito per l'infezione era quello descritto da Frerichs *et al.* (1996). L'esame colturale era protratto, prima di emettere il giudizio, per 3 cicli di 1 settimana ciascuno.

RISULTATI

Esami sierologici:

Nelle Tabelle 1 e 2 sono riportati i risultati dei tre singoli saggi ELISA sui singoli animali, divisi rispettivamente nei Gruppi Giovani (Tab. 1) ed Adulti (Tab. 2).

N°	ELISA Antigen trapping	ELISA Ig. trapping	ELISA Compet.	N°	ELISA Antigen trapping	ELISA Ig. trapping	ELISA Compet.
M1	POS	POS	POS	22	POS	POS	POS
M2	neg	neg	neg	23	POS	neg	POS
M3	POS	POS	POS	24	neg	neg	neg
M4	neg	neg	neg	25	POS	POS	POS
M5	POS	POS	POS	26	neg	neg	neg
M6	N.E.	N.E.	N.E.	27	neg	neg	neg
M7	POS	POS	POS	28	POS	POS	POS
M8	neg	neg	neg	29	neg	neg	neg
M9	POS	POS	POS	30	neg	neg	neg
10	POS	POS	POS	31	POS	POS	POS
11	neg	POS	neg	32	POS	POS	POS
12	neg	neg	neg	33	POS	POS	POS
13	neg	neg	neg	34	neg	neg	neg
14	neg	neg	neg	35	POS	POS	POS
15	POS	POS	POS	36	POS	POS	POS
16	neg	neg	neg	37	neg	neg	neg
17	neg	neg	neg	38	POS	POS	POS
18	neg	neg	neg	39	POS	POS	POS
19	POS	POS	POS	40	POS	POS	POS
20	POS	POS	POS	41	neg	neg	neg
21	POS	POS	POS	42	neg	neg	neg

Tabella 1 - Gruppo Giovani: risultati dei tre saggi ELISA ottenuti sui sieri dei singoli animali.

Table 1 - Young Group: results of the three ELISA assays from single fish serum.

N°	ELISA Antigen trapping	ELISA Ig. trapping	ELISA Compet.	N°	ELISA Antigen trapping	ELISA Ig. trapping	ELISA Compet.
1	POS	neg	POS	11	neg	neg	neg
2	POS	neg	POS	12	neg	neg	POS
3	neg	neg	neg	13	POS	POS	POS
4	neg	neg	neg	14	neg	neg	neg
5	neg	neg	neg	15	neg	neg	neg
6	POS	neg	POS	16	neg	neg	neg
7	neg	neg	neg	17	POS	POS	POS
8	POS	neg	neg	18	neg	neg	neg
9	POS	neg	POS	19	POS	POS	POS
10	neg	neg	neg	20	neg	neg	neg

Tabella 2 - Gruppo Adulti: risultati dei tre saggi ELISA ottenuti sui sieri dei singoli animali.
Table 2 - Adult Group: results of the tree ELISA assays from single fish serum.

(N° dal / from 1 al / to 10 vasca / fish-unit C5. N° dal / from 11 al / to 20 vasca / fish-unit C6)

Legenda tabelle 1 e 2	
POS: Reazione positiva	POS: <i>Positive reaction</i>
neg: Reazione negativa	neg: <i>Negative reaction</i>
N.E: Reazione non eseguita	N.E: <i>Reaction not done</i>
M: Presenza di sintomi di malattia	M: <i>Symptomatic</i>

Esami virologici:

I risultati degli esami virologici saranno descritti dettagliatamente in un secondo lavoro attualmente in preparazione.

Alcuni dati sono però anticipati in questo paragrafo al fine di inquadrare più incisivamente i risultati dei saggi sierologici.

Gruppo Animali Giovani –

La percentuale di identificazione di antigeni virali (positivi e dubbi) con metodi virologici diretti, quali immunofluorescenza su impronte (touch) di tessuto cerebrale ed ELISA sandwich su omogenati di tessuto cerebrale, risulta essere molto bassa, rispettivamente del 5% con l'immunofluorescenza e del 2,5% con l'ELISA sandwich. Sempre utilizzando la metodica dell'ELISA sandwich, ma eseguita sul criolisato del III° passaggio di colture cellulari infettate con omogenati di cervello di animali di questo gruppo, la positività è del 65%.

La RT-PCR, applicata all'omogenato di cervello, è positiva nel 72% dei campioni, percentuale che sale al 79% quando applicata al criolisato di colture cellulari infettate con gli omogenati. Tale percentuale è la più alta ottenuta. Per tale motivo la RT-PCR eseguita sui criolisati del III° passaggio di coltura risulta la reazione più sensibile. Essa identifica come positivi 9 su 9 animali sintomatici mentre la RT-PCR applicata all'omogenato di cervello ne

identifica come positivi 8 su 9. La metodica ELISA sandwich applicata ai criolisati del III° passaggio, ottiene uno “score” di 8 su 9.

Gruppo Animali Adulti –

2 su 10 animali della vasca C5 risultavano negativi ai metodi virologici indiretti, ma positivi a tutti gli altri.

10 su 10 animali della vasca C6 risultavano negativi a tutti i test virologici.

DISCUSSIONI E CONCLUSIONI

Il confronto dei risultati ottenuti con i tre saggi ELISA messi a punto permette di distinguere differenti situazioni. Nel gruppo degli Animali Giovani i tre saggi ELISA in pratica si equivalgono, identificando gli stessi sierici nel 50% circa dei campioni. Nel gruppo degli Animali Adulti è evidente un’inferiore sensibilità della “ELISA Ig trapping” che è positiva nel 15% dei campioni, mentre gli altri due saggi sono positivi nel 40% dei campioni.

Una spiegazione di questa “defaillance” della “ELISA Ig trapping” può risiedere nel fatto che il saggio, pur rivelando solo le Ig specifiche anti-DIEV, cattura anche altre specificità di immunoglobuline presenti nel siero.

Dai dati della virologia risulta che DIEV è presente nel 72% dei giovani, mentre nel siero degli adulti, in cui la circolazione di DIEV è del 10%, sono probabilmente presenti anche immunoglobuline originate da patogeni diversi da DIEV e di irruzione posteriore a questo. Le immunoglobuline diverse da quelle di DIEV occupano la maggior parte dei siti di legame dell’anticorpo monoclonale (2G7) anti-Ig di branzino che lega qualsiasi specificità di Ig.

Sempre in questo gruppo, gli altri due saggi ELISA hanno la stessa capacità di identificare come positivi 8 su 8 sierici anche se i risultati coincidenti sono 7 su 8. I due saggi perciò si equivalgono.

La “ELISA competitiva”, non necessitando di secondi anticorpi diagnostici, può essere impiegata per la determinazione di immunoglobuline originate da DIEV non solo nella specie *D. labrax*, ma in qualsiasi altra specie ittica allevata o selvatica. Questa eccellente caratteristica richiede ovviamente una verifica pratica, ma potenzialmente rende l’ELISA competitiva il saggio di scelta fra i tre saggi sierologici.

La competizione dei sierici di branzino in esame avviene verso un anticorpo monoclonale (1G4) dotato di proprietà virus neutralizzanti: tale caratteristica assume una notevole importanza nel caso si dovessero, a seguito di una eventuale profilassi vaccinale, valutare la qualità degli anticorpi generati da un vaccino anti-DIEV che, se competitori di un anticorpo neutralizzante, avrebbero una propensione di qualità “protettiva”.

Sono inoltre da ricordare le rimarchevoli buone qualità degli anticorpi monoclonali che permettono di ottenere un anticorpo marcato di caratteristiche immutabili nel tempo, producibile in qualsiasi scala e che rende possibili saggi di elevata standardizzazione qualitativa.

Per questo motivo abbiamo considerato la “ELISA competitiva” quale saggio sierologico di scelta e, in seguito, ci riferiremo solo a questo saggio sierologico.

I dati della virologia indicano che i metodi applicabili direttamente al tessuto cerebrale o al suo omogenato, rispettivamente Immunofluorescenza ed “ELISA sandwich”, identificano dal 2,5 al 5% del gruppo Animali Giovani e nessuno nel gruppo Animali Adulti. Nel primo gruppo la percentuale di positivi identificabile con la RT-PCR eseguita su criolisati del III° passaggio in coltura cellulare è del 72%. Poiché le reazioni virologiche dirette necessitano di elevate concentrazioni di antigene virale per fornire reazioni positive, è evidente che nell’allevamento esaminato sussistono condizioni di infettività virale molto diffusa, ma a

basso titolo. A differenza delle condizioni di malattia acuta (come osservabile nella stagione calda), in cui metodi virologici diretti funzionano molto bene, nelle condizioni attuali si osserva che l'ELISA identifica come positivi il 52% dei soggetti del gruppo Animali Giovani. Essa pertanto è di impiego molto consigliabile per valutare condizioni di malattia subclinica poco o nulla apparenti con i test virologici tradizionali.

Nell'ambito del gruppo Animali Adulti si osserva una situazione analoga con risultati negativi per le prove virologiche indirette mentre si possono reperire due soggetti (vasca C5) positivi alle prove virologiche di amplificazione molecolare o culturale. In questa vasca l'ELISA identifica, oltre ai due nominati, altri 3 sieropositivi.

Nella vasca C6 nessun animale è positivo a qualsiasi test virologico mentre l'ELISA identifica 3 sieropositivi. Si può arguire che gli animali adulti, negativi virologici e sierologici, siano costituzionalmente refrattari alle precedenti ed attuali ondate di infezione virale mentre gli adulti solo sieropositivi abbiano sviluppato anticorpi protettivi in grado di debellare del tutto l'infezione virale. In questo caso l'accertamento tramite ELISA dimostra tutta la sua potenzialità diagnostica essendo gli anticorpi anti-DIEV l'unica traccia dell'infezione pregressa.

I risultati dei saggi sierologici dimostrano che i tre metodi ELISA messi a punto permettono non solo di attuare con facilità uno studio sierologico, ma anche di avere informazioni epidemiologiche non raggiungibili con i metodi virologici usualmente utilizzati per la diagnosi di Nodaviriosi.

Da questo punto di vista l'esecuzione di esami sierologici come valutazione dello stato sanitario di allevamento risulta sicuramente una valida procedura che permette di ottenere un quadro generale sulla eventuale presenza e diffusione, presente e passata, di DIEV.

Dobbiamo inoltre sottolineare i molteplici fattori che rendono lo screening sierologico efficace e sicuramente affiancabile a quello virologico tradizionale.

Il metodo tradizionale di isolamento del DIEV su colture cellulari necessita di 3 passaggi di circa una settimana ciascuno per un tempo complessivo di esecuzione di 21 giorni circa. I metodi sierologici da noi messi a punto possono dare un quadro della situazione epidemiologica degli animali il giorno stesso del prelievo di emosiero sui pesci.

Rispetto poi al metodo sierologico tradizionale di sieroneutralizzazione, l'ELISA risulta più rapida, eseguibile in tutti i laboratori e su vasta scala, di basso costo, di elevata possibilità di standardizzazione grazie all'impiego di anticorpi monoclonali.

In questo periodo in cui criteri di economicità si vanno facendo più stringenti, un esame di tipo sierologico ELISA come quello da noi descritto è molto più economico del saggio virologico idoneo a dimostrare la circolazione virale esistente in un allevamento ed eseguibile in tempi rapidi su tessuto cerebrale, quale è la PCR. Inoltre questa necessita di strutture di laboratorio e di personale altamente specializzato; pertanto la ELISA da noi messa a punto presenta un minor impatto economico e maggiore flessibilità.

L'utilizzo di saggi sierologici consentirebbe anche di monitorare in modo rapido, efficace e flessibile, partite di pesci da immettere in allevamento, al fine di effettuare un costante controllo sullo stato sanitario delle nuove immissioni per evitare il propagarsi della malattia.

RINGRAZIAMENTI

La dottoressa E. Brocchi, responsabile del Reparto Biotecnologie dell'IZS della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, ha fornito un contributo determinante a questo lavoro.

Il dottor G. Bovo, responsabile del Laboratorio di Ittiopatologia dell'IZS delle Venezie, ha fornito materiali indispensabili alla messa a punto dei metodi sierologici.

Parti del lavoro sono state svolte con il contributo finanziario del Ministero della Salute e del Ministero delle Politiche Agricole.

BIBLIOGRAFIA

Borrego B., Carletti M., Meroni A., De Simone N. & Brocchi E. (2001). Development of monoclonal antibody-based ELISAs for the detection of antibodies against Nodavirus in fish serum. *X International Symposium of World Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians; Salsomaggiore-Parma, Italy, 4-7 July 2001.*

Brocchi E., Gamba D., Poumarat F., Martel J.L. & De Simone F. (1993). Improvements in the diagnosis of contagious bovine pleuropneumonia through the use of monoclonal antibodies. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, 12, 2: 559-570.

Chomzynski F. & Sacchi N. (1987). Single step methods of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, 162: 156-159.

De Mas S., Vicari N., Pellati D., Bertazzo V., Bovo G., Borghesan F., Montesi F., Mutinelli F., Dalla Valle L. & Tisato E. (1998). Applicazione della tecnica RT-PCR alla diagnosi di Encefaloretinopatia virale del branzino (*Dicentrarchus labrax*). *Boll. Soc. It. Patol. Ittica*, 23: 11-23.

Frerichs G.N., Rodger H.D. & Peric Z. (1996). Cell culture isolation of piscine neuropathy nodavirus from juvenile sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *J. Gen. Virology*, 77: 2067-2071.