

# ENCEFALO-RETINOPATIA VIRALE (VNN) IN STADI GIOVANILI DI BRANZINO (*D. Labrax*) IN ASSENZA DI LESIONI TIPICHE DI VACUOLIZZAZIONE CELLULARE

Galeotti M.<sup>1</sup>, Beraldo P.<sup>1</sup>, Patarnello P.<sup>3</sup>, Sarli G.<sup>2</sup>, Volpatti D.<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Sezione di Biologia e Patologia Animale - Dipartimento di Scienze della Produzione Animale - Facoltà di Medicina Veterinaria- Università di Udine.

<sup>2</sup>Sezione di Patologia Generale e Anatomia Patologica Veterinaria - Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale - Facoltà di Medicina Veterinaria- Università di Bologna.

<sup>3</sup>Veterinario L.P. Specialista in Acquacoltura e Ittiopatologia.

## INTRODUZIONE

L'encefalo-retinopatia virale o "viral nervous necrosis" (VNN) è una malattia virale segnalata per la prima volta in branzini allevati nell'Isola di Martinica da Bellance e Gallet di St.-Aurin nel 1988. La malattia fino dall'inizio venne associata a sintomatologia nervosa e a presenza di lesioni a carico del sistema nervoso centrale. Dalla prima segnalazione ne sono avvenute numerose altre in differenti specie ittiche marine allevate, interessando prevalentemente gli stadi larvali e giovanili: nel barramundi, *Lates calcarifer* (Glazebrook *et al.*, 1990; Reanault *et al.*, 1991), ancora nel branzino, *Dicentrarchus labrax* (Breuil *et al.*, 1991), nel rombo, *Scotophilus maximus* (Bloch e Gravningen *et al.*, 1991) e nell'*Hypoglossus hypoglossus* (Grotmol *et al.*, 1995). Analogamente è stata segnalata in *Oplegnatus fasciatus* (Yoshikoshi e Inoue, 1990), *Epinephelus akaara* (Mori *et al.*, 1991), *Pseudocarex dentex* (Mori *et al.*, 1992), *Paralichthys olivaceus* (Nguyen *et al.*, 1994), *Epinephelus moara* (Nakai *et al.*, 1994). L'agente è stato classificato come appartenente alla famiglia dei Nodaviridae. Indagini con l'impiego della PCR hanno stabilito l'esistenza di una sequenza conservata nel "coat-protein" dei nodavirus dei pesci, con una stretta correlazione tra loro (92%), ma una divergenza rispetto ai nodavirus degli insetti (Nishizawa *et al.*, 1995). Le prime segnalazioni della malattia erano a carico di stadi larvali e di avannotti, mentre successivamente è stata descritta anche in adulti all'ingrasso (Le Breton *et al.*, 1997) e, in forma asintomatica, nei riproduttori di striped jack (Nishizawa *et al.*, 1994). Nel branzino la malattia è condizionata dalla temperatura in quanto a basse temperature (13°C) non si manifesta, oppure i sintomi sono molto lievi, mentre a temperature più alte (25-26°C) si osservano gli episodi più gravi, accompagnati da forti mortalità.

La sintomatologia appare in genere al 10° giorno dalla schiusa, con un massimo tra 25 e 40 giorni, con una mortalità che può raggiungere il 100% dell'effettivo, in caso di larve, mentre è più ridotta in caso di giovanili (Sweetman *et al.*, 1996). Nei giovanili di 0.5 - 5 g la sintomatologia è di tipo nervoso, con nuoto anormale e scoordinato, accompagnato da incurvamento del dorso. Nei soggetti di taglia compresa fra 10 a 600 g si possono avere sia la forma acuta che subacuta, con perdita

dell'appetito e alterazioni del nuoto, fino a sintomi nervosi con nuoto rotatorio, ipereccitabilità, movimenti di entrata ed uscita dall'acqua, talvolta cecità (Sweetman *et al.*, 1996).

A livello istologico, in tali specie, la malattia provoca una intensa vacuolizzazione citoplasmatica dei neuroni del S.N.C., mentre nell'occhio i vacuoli sono localizzati esclusivamente negli strati nucleari della retina (Grotmol *et al.*, 1997; Bovo *et al.*, 1996; Jung-Sungju *et al.*, 1996; Nguyen Hd *et al.*, 1996; Le Breton *et al.*, 1997).

L'esame istopatologico (IS) ha costituito fino dall'inizio il metodo più valido per individuare larve o giovanili affetti dalla malattia, in quanto il netto quadro di spongiosi a carico del cervello, midollo spinale e occhio ha permesso di emettere diagnosi di nodaviriosi. A questo esame si è unita con successo l'immunofluorescenza (IF) e l'immunoistochimica (IIC) mediante anticorpi policlonali o monoclonali per il virus della nodaviriosi del branzino, abbinato alla individuazione del virus (dimensioni medie 28 - 30 nm) mediante microscopia elettronica. Le tipiche lesioni istologiche della malattia sono state sempre descritte negli stadi larvali e nei giovanili delle varie specie colpite da nodavirus, mentre nei soggetti sopra l'anno di età (Bovo *et al.*, 1996) il quadro istologico non risulta sempre chiaro, e sono molto scarse o mancano del tutto le tipiche vacuolizzazioni delle cellule nervose.

Al momento in letteratura sono scarse le segnalazioni di casi di nodaviriosi con assenza delle tipiche lesioni istologiche in specie di pesci sensibili alla malattia sotto l'anno di età.

Il presente lavoro descrive per la prima volta il rinvenimento di numerosi soggetti giovanili di branzino, di età compresa fra i 60 e i 280 giorni, colpiti da nodaviriosi sintomatica e asintomatica, nei quali mancano del tutto le tipiche lesioni di vacuolizzazione delle cellule nervose del S.N.C. e dell'occhio, ma che risultano in vario modo positivi con la tecnica IIC. Questo risultato abbassa notevolmente l'età sotto la quale la nodaviriosi del branzino può essere presente in soggetti con sintomatologia clinica, senza presentare evidenti lesioni istologiche.

## MATERIALI E METODI

I giovanili di branzino di età compresa fra i 60 e i 280 giorni provenivano tutti da allevamenti presenti in varie aree del Mediterraneo occidentale, alto Ionio (Grecia). I soggetti sono stati prelevati in 10 campionamenti, effettuati in quattro differenti siti (A,B,C e D) in un arco di tempo che andava da settembre 1998 a marzo 1999. I pesci presentavano una sintomatologia clinica molto varia, come illustrato nelle tabelle 1 e 2, che riportano soltanto una parte dei dati. Alcuni non presentavano alcuna sintomatologia evidente, ma nelle vasche di allevamento era presente una mortalità da lieve a discreta; altri presentavano un grave stato di denutrizione con retrazione

addominale, oppure deformazioni scheletriche, mentre altri ancora presentavano esoftalmo, rigonfiamento occipitale e timpanismo addominale. In alcuni gruppi era evidente una tipica sintomatologia nervosa. Un campione proveniva da un gruppo di soggetti che apparentemente sani, senza alcuna sintomatologia.

I campioni sono stati fissati immediatamente dopo il prelievo in formalina tamponata al 10%. La permanenza in formalina non ha superato i 7 giorni. Successivamente sono stati inclusi in paraffina per ottenere delle sezioni seriate di 5  $\mu$  utilizzate per le colorazioni istologiche e per l'IIC. Il metodo di rivelazione utilizzato per l'IIC è stato quello dell'avidina-biotina-complex (ABC)-perossidasi (DAKO). Le sezioni sono state incubate con un anticorpo policlonale anti-virus della VNN del branzino, gentilmente fornito dal Dr. Baudin-Laurencin, (CNEVA, Brest). I controlli utilizzati sono stati i seguenti: anticorpo policlonale per il virus della IPN dei pesci, utilizzato alla stessa diluizione di lavoro dell'anticorpo per la VNN, su sezioni sicuramente positive per VNN; controllo di cervello di branzino adulto sicuramente positivo; controllo di cervello di branzino adulto sicuramente negativo; omissione dell'anticorpo primario.

## RISULTATI

I risultati delle indagini istologiche e immunoistochimiche che riguardano i pesci provenienti dai siti A e B, che a nostro avviso risultano più rappresentativi, sono sinteticamente riportati nelle tabelle 1 e 2. In breve dei 5 campionamenti effettuati nel sito A (acqua di pozzo, 18°C, età 60-75 giorni), 3 manifestavano sintomi nervosi con esame IS + e IIC +, mentre 2 non presentavano sintomi nervosi, con esame IS (-) e IIC +. Nel sito B (acqua di mare, 15-16°C, età 120-198 giorni) entrambi i campioni non presentavano sintomatologia nervosa, con esame IS (-), ma uno risultava IIC (-) mentre l'altro IIC +. Nel sito C (acqua di mare, 14-15°C, età 140-240 giorni), 1 campione non esibiva sintomatologia nervosa, presenta esame IS (-) e IIC +, mentre l'altro campione esibiva sintomatologia nervosa, con esame IS + e IIC +. Nel sito D (acqua di mare, 26-27°C, età 240-280 giorni), l'unico campione presentava sintomatologia nervosa con esame IS (-) e IIC +. Nel complesso dei 10 campioni esaminati, 5 presentavano sintomatologia nervosa, accompagnata da lesioni istologiche (eccetto un campione) e tutti presentano esame IIC +. 5 campioni non esibivano sintomatologia nervosa, presentano istologia negativa, e in 4 su 5 presentano esame IIC +. Nei soggetti che presentano lesioni istologiche classiche di VNN, il quadro è dominato da una forte vacuolizzazione dei vari strati della retina e da una intensa vacuolizzazione del cervello, midollo allungato e spinale (neuroni e neuroglia). La positività IIC è sempre molto pronunciata. Nei campioni di pesci che presentano, invece, un quadro istologico meno conclamato, si osservano

vacuoli nel citoplasma di alcune cellule degli strati retinici, soprattutto nello strato nucleare interno, mentre nel SNC si evidenziano rari vacuoli nel citoplasma dei neuroni del midollo allungato e in quello spinale. Il quadro è spesso accompagnato da iperacidofilia del citoplasma di alcuni neuroni, mentre altri mostrano segni di rarefazione. La positività IIC è presente in un numero discreto di neuroni dei tessuti appena descritti. In altri soggetti il numero di cellule vacuolizzate nella retina e nel SNC appare molto ridotto, come pure le cellule positive all'esame IIC, effettuato su sezioni seriate. Spesso le cellule che risultano positive all'IIC non sono quelle che presentano la tipica vacuolizzazione del citoplasma. Nell'ultimo quadro istologico osservato nella presente indagine, non si evidenziano assolutamente lesioni riferibili alla VNN, né altre lesioni di tipo degenerativo e infiammatorio. All'esame IIC si osservano invece rare cellule positive nel SNC, ma soprattutto a carico della retina. Nei campioni con queste caratteristiche, il 14% dei pesci esaminati presentava il quadro appena descritto.

TABELLA 1 . Postlarve di branzino con assenza di lesione classiche di VNN.

Provenienza	Sintomi clinici e les. macroscopiche	Istologia	Immunoistochimica
Gen.'99 Sito A Acqua di pozzo 18°C 60 giorni	sintomi nervosi esoftalmo; rigonfiamento occipitale; timpanismo vescicale	Occhio: vacuoli nel citoplasma di alcune cellule degli strati retinici. SNC: rari vacuoli nel citoplasma dei neuroni del midollo allungato e spinale. Iperacidofilia dei pirenofori. Rarefazione del citoplasma di alcuni neuroni.	Occhio: cellule positive localizzate negli strati plessiforme interno, esterno e in quello nucleare. SNC: positiviti i pirenofori di vari neuroni localizzati nel midollo allungato.
Mar.'99 Sito A Acqua di pozzo 18°C 68 giorni	deformazioni scheletriche; grave stato di denutrizione	Assenza di evidenti lesioni a carico del SNC, fatta eccezione per rarissime vacuolizzazioni di pochi neuroni. Rarefazione del citoplasma delle cellule degli strati retinici.	Occhio: rare cellule positive localizzate negli strati plessiforme interno, esterno e in quello nucleare. Il 14% dei soggetti risulta positivo.
Feb.'99 Sito A Acqua di pozzo 18°C 75 giorni	grave stato di denutrizione con retrazione addominale	Assenza di evidenti lesioni a carico del SNC. In alcuni soggetti la mucosa intestinale appare appiattita con aspetti degenerativi.	Occhio: positive rare cellule dello strato nucleare interno; SNC: positiviti i pirenofori di alcuni neuroni localizzati nel midollo allungato; Il 14% dei soggetti risulta positivo.

TABELLA 2. Giovanili di branzino con differenti quadri di VNN a temperature dell'acqua di 14-15°C.

Provenienza	Sintomi clinici e les. macroscopiche	Istologia	Immunohistochimica
Feb. 99 Sito C Acqua di mare 14.15°C 220-240 gior.	lieve mortalità ; rari sintomi nervosi	1° quadro (16) Occhio: vacuolizzazione di varie cellule dello strato nucleare interno. SNC: vacuolizzazione di numerose cellule del diencefalo, mesencefalo, cervelletto, midollo allungato; inclusi cit. e fenomeni carioretici nelle cellule della neuroglia; congestione vasale	Occhio: positivo SNC: positivo
	"	2° quadro (4) Occhio: vacuolizzazione di alcune cellule dello strato nucleare interno. SNC: assenza del tipico aspetto spongioso dei neuroni, rari fenomeni iniziali di vacuolizzazione.	Occhio: positivo SNC: positivo
	"	3° quadro (4) SNC: forte congestione dei vasi nel cervello; assenza vacuoli cit.	SNC: positivo

## DISCUSSIONE

La encefalo-retinopatia virale del branzino è una malattia che provoca gravi mortalità negli stadi larvali e giovanili di questa specie. Negli stadi larvali la sintomatologia clinica è evidente, mentre nei giovanili la malattia può presentarsi in modo acuto o subacuto, con una riduzione sensibile della mortalità e una diminuzione della sintomatologia clinica. La sintomatologia nervosa può anche non comparire, pur riscontrando una continua mortalità da lieve a pronunciata.

Le lesioni istologiche a carico del S.N.C. e dell'occhio hanno sempre caratterizzato i focolai di malattia degli stadi larvali e giovanili del branzino (Breuil *et al.*, 1991, Bovo *et al.*, 1996) come quelli di altre specie sensibili alla nodaviriosi (Glazebrook *et al.*, 1990; Mori *et al.*, 1991; Nguyen *et al.*, 1996; Grotmol *et al.*, 1997). Le lesioni più caratteristiche sono costituite da vacuolizzazione lieve o molto pronunciata del citoplasma dei neuroni del S.N.C e dello strato nucleare profondo della retina. Nel S.N.C. un forte interessamento si osserva a carico del midollo spinale, soprattutto nella porzione soprastante alla vescica natatoria. L'esame istologico è stato utilizzato spesso al fine di attuare ampi monitoraggi per valutare la diffusione della malattia nelle avannotterie (Sweetman *et al.*, 1996).

La malattia subisce una forte attenuazione della sintomatologia e delle lesioni istologiche passando a soggetti di circa un anno. In questi ultimi infatti non è sempre facile osservare i tipici fenomeni di vacuolizzazione delle cellule nervose, che vengono talvolta sostituiti da forte congestione del

tessuto e da blandi fenomeni degenerativi a carico dei neuroni del S.N.C. (Bovo et al., 1996). In questi soggetti il solo esame istologico non sembra garantire efficacia al fine di individuare in modo rapido e corretto focolai di malattia. Questa situazione non è mai stata segnalata in soggetti allo stadio di postlarve e in giovanili, nei quali l'indagine istologica ha sempre garantito, almeno in via preliminare, un valido sistema di individuazione di soggetti ammalati, per poi procedere con indagini più approfondite (IF, IIC, ME, PCR).

I risultati di questa indagine, condotta in allevamenti di varie aree del Mediterraneo occidentale, alto Ionio (Grecia), sembrano indicare che è possibile individuare episodi di malattia, con sintomatologia scarsa o poco definita, nei quali si rinvenivano giovanili di branzino che all'età di 60 giorni (postlarve) non presentano istologicamente le classiche lesioni imputabili a nodaviriosi, ma risultano positive all'esame IIC. Lo stesso dato si può osservare anche in taglie più grandi (120-240 giorni) in differenti condizioni di allevamento, con acque a 14-15°C, dove si rinvenivano focolai di malattia con assenza di tipica sintomatologia nervosa, ma positività IIC in 3 campioni su 4. Le basse temperature condizionano sicuramente la forma acuta di malattia, che rimane però ad uno stato latente con una sintomatologia subdola. Interessante appare anche il risultato del campione del sito D (età 240-280 giorni) con acque a 26-27°C, ottimali per il manifestarsi della malattia, nel quale accanto ad una scarsa sintomatologia nervosa, non si rinvenivano lesioni istologiche tipiche, ma una costante positività IIC.

Questa ricerca ha permesso di evidenziare alcuni aspetti importanti sulla nodaviriosi del branzino: 1) anche in soggetti allo stadio di postlarve, o comunque giovanili (60-75 giorni), la VNN può manifestarsi con assenza di tipiche lesioni di vacuolizzazione delle cellule nervose; 2) la VNN può provocare focolai di malattia, anche se con sintomatologia scarsa o inapparente, a temperature basse come 14-15°C, indicando che anche nel branzino si assiste ad un adattamento del virus a temperature più basse rispetto a quelle classiche; 3) nei casi con scarsissime cellule positive all'esame IIC, è opportuno prestare molta attenzione alla retina, che appare un sito di frequente reperimento dell'antigene virale; 4) l'esame IIC rappresenta un metodo estremamente sensibile per l'individuazione di pesci affetti da VNN con assenza di lesioni classiche e in presenza di quantità bassissime di virus.

## BIBLIOGRAFIA

1. BELLANCE R., GALLET de SAINT-AURIN D. (1988) - L'encéphalite virale du loup de mer. *Caraïbes Medical*, **Avril, Mai, Juin**; 105-114.
2. 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.
3. BLOCH B., GRAVNINGEN K., LARSEN J.L. (1991) - Encephalo-myelitis among turbot associated with a picornavirus-like agent. *Dis. Aquat. Org.*, **10**; 65-70.

4. BOVO G., BORGHESAN F., MUTINELLI F., MONTESI F., COMUZZI M. (1996) - Encefalo-retinopatia virale del branzino d'allevamento: prima segnalazione nel territorio nazionale. *Boll. Soc. It. Patol. Ittica*, 19; 52-64.
5. 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
6. GROTMOL S., TOTLAND GK., 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.
7. GROTMOL S., TOTLAND GK., THOURUD K. (1997) - Vacuolating encephalopathy associated with a nodavirus-like agent: a probable cause of mass mortality of cultured larval and juveniles Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus*. *Dis. Aquat. Org.*, 29(2); 85-97.
8. JUNG-SUNGU, MIYAZAKI T., MIYATA M., OISHI T. (1996) - Histopathological studies on viral nervous necrosis in a new host, Japanese sea bass *Lateolabrax japonicus*. *Bull. Fac. Biores.*, 16; 9-16.
9. 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*. *Journal of Fish Disease*. 20 (2) 145-151.
10. 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 (*Pseudocarranx dentex*) with nervous necrosis. *Virology*, 187; 368-371.
11. 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. *Gyobyu Kenkyu*, 26; 209-210.
12. 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 Pathology*, 29; 211-212.
13. NGUYEN HD., NAKAI T., MUROGA K. (1996) - Progression of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) infection in naturally and experimentally infected striped jack *Pseudocarranx dentex* larvae. *Dis. Aquat. Org.*, 24(2); 99-105.
14. NGUYEN HD., MEKUCHI K., IMURA K., NAKAI T., NISHIZAWA T., MUROGA K. (1994) - Occurrence of viral nervous necrosis (VNN) in hatchery-reared juveniles Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Fisheries Science* 60, 551-554.
15. NISHIZAWA T., MORI T., FURUHASHI M., NAKAI T., FURUSAWA I., MUROGA K. (1995) - Comparison of the coat protein genes of five fish nodaviruses, the causative agents of viral nervous necrosis in marine fish. *J. Gen. Vir.*, 76; 1563-1569.
16. NISHIZAWA T., MORI T., 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(2); 103-107.
17. RENAULT T., HAFFNER Ph., 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; 68-73.
18. SWEETMAN E., SWEETMAN J., Le BRETON A., GRISEZ L. (1996) - Nodavirus: a review of the findings of the XIV/NODA/95 investigation. "Seabass and seabream culture: problems and prospects", 16<sup>th</sup>-18<sup>th</sup> october, Verona-Italy; 87-101.
19. YOSHIKOSHI K. e INOUE K. (1990). Viral nervous necrosis in hatchery-reared larvae and juveniles of Japanese parrotfish, *Oplegnathus fasciatus*. *Journal of Fish Diseases* 13, 69-77.