

Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society

Vol 56, No 2 (2005)



Isolation, characterization and sequence determination of Noda virus from sea bass (*Dicentrarchus labrax*L.) reared in freshwater and marine facilities in Greece

E. XYLOURI (Ε. ΞΥΛΟΥΡΗ), J. KOTZAMANIS (Ι. ΚΟΤΖΑΜΑΝΗΣ), F. ATHANASSOPOULOU (ΑΘΑΝΑΣΟΠΟΥΛΟΥ Φ.), L. DONG, A. ARGYROKASTRITIS (ΑΛ. ΑΡΓΥΡΟΚΑΣΤΡΙΤΗΣ), E. FRAGKIADAKI (ΕΙΡ. ΦΡΑΓΚΙΑΔΑΚΗ)

doi: [10.12681/jhvms.15074](https://doi.org/10.12681/jhvms.15074)

To cite this article:

XYLOURI (Ε. ΞΥΛΟΥΡΗ) Ε., ΚΟΤΖΑΜΑΝΗΣ (Ι. ΚΟΤΖΑΜΑΝΗΣ) J., ΑΘΑΝΑΣΟΠΟΥΛΟΥ (ΑΘΑΝΑΣΟΠΟΥΛΟΥ Φ.) F., DONG, L., ΑΡΓΥΡΟΚΑΣΤΡΙΤΗΣ (ΑΛ. ΑΡΓΥΡΟΚΑΣΤΡΙΤΗΣ) Α., & ΦΡΑΓΚΙΑΔΑΚΗ (ΕΙΡ. ΦΡΑΓΚΙΑΔΑΚΗ) Ε. (2017). Isolation, characterization and sequence determination of Noda virus from sea bass (*Dicentrarchus labrax*L.) reared in freshwater and marine facilities in Greece. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 56(2), 105–113. <https://doi.org/10.12681/jhvms.15074>

Απομόνωση και μοριακός χαρακτηρισμός του γενώματος του ιού *Noda* σε λαβράκια (*Dicentrarchus labrax* L.), που εκτρέφονται σε γλυκό και θαλασσινό νερό στην Ελλάδα

Ε. Ξυλούρη¹, Ι. Κοτζαμάνης^{2,3}, Φ. Αθανασοπούλου⁴,
Li Dong¹, Αλ. Αργυροκαστρίτης⁵, Ε. Φραγκιαδάκη¹

ΠΕΡΙΛΗΨΗ. Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η απομόνωση του ιού *Noda* από ιχθύες γλυκού νερού και ειδικά από το είδος *Dicentrarchus labrax* L. (λαβράκι) και ο μοριακός χαρακτηρισμός του. Σε προηγούμενες μελέτες έχει αναφερθεί η ανίχνευση του ιού *Noda* με τη μέθοδο της Αλυσιδωτής Αντίδρασης της Πολυμεράσης (ΑΑΠ) σε λαβράκια (*Dicentrarchus labrax*) που εμφάνιζαν κλινικά συμπτώματα και εκτρέφονταν υπό εντακτικές συνθήκες σε γλυκό νερό. Δεν είχε, όμως, επιτευχθεί η απομόνωσή του σε κυτταροκαλλιέργεια. Η παρούσα μελέτη περιγράφει την απομόνωση του ιού *Noda* από ελληνικές εκτροφές λαβρακιού που εμφάνιζαν κλινικά συμπτώματα και που εκτρέφονταν τόσο σε θαλάσσιο όσο και σε γλυκό νερό. Ο ιός απομονώθηκε στην ειδική συνεχή κυτταρική σειρά SSN-1, εκδηλώνοντας χαρακτηριστικό κυτταροπαθολογικό αποτέλεσμα υπό μορφή κενοτοποίησης και εκφύλισης. Παράλληλα, στο σύνολο των δειγμάτων εγκεφαλικού ιστού και οφθαλμών που προέρχονταν από μολυσμένα λαβράκια, ανιχνεύθηκε, με χρήση της Ανάστροφης Μεταγραφής – της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (Reverse Transcription-PCR) και με την τεχνική της nested RT-PCR (nested Reverse Transcription) – PCR, ένθετη ανάστροφης αντιγραφής- PCR, μια γενωμική περιοχή μεγέθους 255 ζευγών βάσεων (ζβ). Η σύγκριση της αλληλουχίας των νουκλεοτιδίων της παραπάνω περιοχής με αντίστοιχη που ανιχνεύθηκε σε ασθενή λαβράκια ευρωπαϊκής εκτροφής και σε άλλα είδη ιχθύων ανέδειξε μεγάλο βαθμό ομολογίας μεταξύ τους.

Λέξεις κλειδιά: *Dicentrarchus labrax*, ιός *Noda*, απομόνωση, μοριακός χαρακτηρισμός του γενώματος του ιού

Isolation, characterization and sequence determination of *Noda* virus from sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) reared in freshwater and marine facilities in Greece

Xylouri E.¹, Kotzamanis J.^{2,3}, Athanassopoulou F.⁴,
Li Dong¹, Argyrokastritis A.⁵, Fragkiadaki E.¹

ABSTRACT. The present study aims to characterize *Noda* virus isolates from freshwater and marine fish, specifically from species *Dicentrarchus labrax* (sea bass). Previous works reported the detection of *Noda* virus only by using PCR, in cultured *Dicentrarchus labrax* showing clinical symptoms. Here we describe the isolation of *Noda* virus from symptomatic sea bass cultured in sea and freshwater facilities in Greece. The virus was isolated in the continuous cell line SSN -1, exhibiting characteristic cytopathic effect, vacuolation and degeneration of the monolayer. In parallel, in all cerebral tissue samples isolated from infected individuals, a 255 bp viral fragment has been detected, using Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) and nested PCR. Comparison of the amplified sequence was detected in diseased fish in European farms and in other piscine species revealed a high nucleotide homology.

Key words: *Dicentrarchus labrax*, *Noda* virus, isolation, characterization, viral DNA sequencing

¹ Εργαστήριο Ανατομίας & Φυσιολογίας Αγροτικών Ζώων, Τμήμα Ζωικής Παραγωγής, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ιερά οδός 75, 118 55, Αθήνα, Ελλάδα. e-mail: efxil@aua.gr

² Institut für Physiologische Chemie und Pathobiochemie, Abteilung Angewandte Molekularbiologie Johannes Gutenberg-Universität.

³ Εργαστήριο Διατροφής και Παθολογίας Ιχθύων, Ινστιτούτο Υδατοκαλλιέργειών, Ελληνικό Κέντρο Θαλασσίων Ερευνών, Αγ. Κοσμάς, Ελληνικό, 166 04, Αθήνα.

⁴ Εργαστήριο Ιχθυολογίας-Ιχθυοπαθολογίας, Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τριγάλων 224, 431 00, Καρδίτσα.

⁵ Εργ. Γενικής & Ειδικής Ζωοτεχνίας, Τμήμα Ζωικής Παραγωγής, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

¹ Department of Anatomy & Physiology of Farm Animals, Faculty of Animal Science, Agricultural University of Athens, Iera Odos 75, 118 55, Athens, Greece. E-mail: efxil@aua.gr

² Institut für Physiologische Chemie und Pathobiochemie, Abteilung Angewandte Molekularbiologie Johannes Gutenberg-Universität.

³ Laboratory of Fish Nutrition and Pathology, Institute of Aquaculture, Hellenic Centre for Marine Research, 166 04, Athens, Greece.

⁴ Laboratory of Ichthyology, Fish Diseases & Aquaculture, Faculty of Veterinary Medicine, School of Health Sciences, University of Thessaly, Trikalon 224, 431 00, Karditsa, Greece.

⁵ Department of Animal Breeding and Husbandry, Faculty of Animal Science, Agricultural University of Athens, Greece.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι αναφορές για ιογενείς λοιμώξεις σε εκτρεφόμενα θαλάσσια είδη ιχθύων συνεχώς αυξάνονται λόγω της ραγδαίας παγκόσμιας ανάπτυξης του τομέα των ιχθυοκαλλιεργειών. Ανάμεσα στις λοιμώξεις αυτές, η Ιογενής Εγκεφαλοπάθεια και Αμφιβληστροειδοπάθεια [(IEA) ή Ιογενής Νέκρωση του Νευρικού Ιστού -INN)], που προκαλείται από τον ιό *Noda*, είναι από τις πιο σημαντικές, προσβάλλοντας ποικίλα είδη ιχθύων ανά τον κόσμο. Ο ιός της IEA ανήκει στους *Betanodaviruses*, που αποτελούν νέο μέλος της οικογένειας *Nodaviridae* (Mori et al., 1992; Comps et al., 1994). Η οικογένεια αυτή περιλαμβάνει μικρούς, εικοσαεδρικούς RNA ιούς, που προσβάλλουν ευρύ φάσμα εντόμων και ιχθύων (Kaesbergh, 1987, Mori et al., 1992). Το γένομα του ιού *Noda* των ιχθύων αποτελείται από δύο μονόκλιωνα μόρια RNA (+). Το RNA 1 (~1,01 × 10⁶ Da) κωδικοποιεί μια μη δομική πρωτεΐνη με μοριακό βάρος περίπου 110 kDa (Nagai and Nishizawa, 1999), ενώ το RNA 2 (~0,49 × 10⁶ Da) κωδικοποιεί μια πρόδρομη πρωτεΐνη του ιϊκού περιβλήματος με μοριακό βάρος 42 kDa.

Ο ιός *Noda* ανιχνεύεται σε διάφορα είδη ιχθύων της Μεσογείου (Iwamoto et al., 1999; Skliris et al., 2001; Bovo et al., 1999), νόσημα όμως έχει παρατηρηθεί μόνο σε εκτρεφόμενα θαλάσσια είδη ιχθύων. Το λαβράκι είναι το πιο ευπαθές εκτρεφόμενο θαλάσσιο είδος, ενώ φορείς του ιού έχουν αποδειχτεί και οι τσιπούρες (*Sparus aurata* L.) (Thiery et al., 1999a, Breuil et al., 2001, Castri et al., 2001).

Ο ιός είναι ευαίσθητος σε συνθήκες εργαστηρίου και δεν επιβιώνει πάνω από 6 μήνες (Frerichs et al., 2000), ενώ οι αναφορές που αφορούν στην παρουσία και στην επιβίωσή του σε ιχθείς γλυκού νερού είναι ελάχιστες. Οι Athanassopoulou et al. (2003, 2004) ανίχνευσαν για πρώτη φορά τον ιό στην Ελλάδα σε ασθενή λαβράκια που εκτρέφονταν σε γλυκό νερό, καθώς και σε οξύρρυγχους με PCR, ενώ ο Jalil J., (2004, προσωπική επικοινωνία) έχει αναφέρει συμπτώματα σε κέφαλο (*Liza auratus*).

Οι Hedge et al. (2003), βασιζόμενοι σε βιοχημικές και γενωμικές αναλύσεις ενοφθαλμισμένων κυτταροκαλλιεργειών, επιχείρησαν να ταυτοποιήσουν έναν ιό, που απομόνωσαν από ασθενές άτομο του είδους *Poecilia reticulata* (guppy), το οποίο διαβίωσε σε ενυδρείο με γλυκό νερό. Οι ερευνητές επιβεβαίωσαν την παρουσία ενός στελέχους του ιού *Noda*, το οποίο ανήκε στην ομάδα RGNNV και είχε αντιγονική συγγένεια με τον ιό *Noda* που απομονωνόταν από θαλάσσια είδη ιχθύων.

Η ανίχνευση του ιού *Noda* με ΑΑΠ (PCR) έχει επιτευχθεί σε ασθενή λαβράκια που προέρχονταν

INTRODUCTION

Due to excess aquacultures' development in worldwide scale, reports on viral infections in cultured marine fish are increasing. Viral Encephalopathy - Retinopathy (VER) or Viral Neural Necrosis (VNN) caused by *Noda* virus is one of the most devastating viral disease in a variety of marine fish. VER virus belongs to *Betanodaviruses*, a novel member of the *Nodaviridae* family (Mori et al., 1992; Comps et al., 1994). *Nodaviridae* includes small, icosahedral RNA viruses, infecting a wide range of insect and fish species (Kaesbergh, 1987, Mori et al., 1992). The genome of piscine *Noda* virus is constituted of two single-stranded, positive-sense RNA molecules. RNA-1 (~1,01 × 10⁶ Da) encodes a non-structural 110 kDa protein (Nagai and Nishizawa, 1999), whereas RNA-2 (~0,49 × 10⁶ Da) encodes a 42 kDa coat protein precursor.

Although *Noda* virus has been detected in various Mediterranean fish species (Iwamoto et al., 1999; Skliris et al., 2001; Bovo et al., 1999), incidence of the disease has been reported only in cultured marine fish. Sea bass is the most commonly affected cultured Mediterranean marine species, although carriers have been found also in sea bream (*Sparus aurata* L.) (Thiery et al., 1999a, Breuil et al., 2001, Castri et al., 2001).

The virus has been proved sensitive in laboratory conditions and was able to survive up to 6 months (Frerichs et al., 2000). There are only few reports indicating its presence and survival in fresh water fish. Athanassopoulou et al. (2003, 2004) reported the presence of the virus in cultured sea bass and sturgeon in freshwater for the first time using PCR, and Jalil J. (2004, personal communication) reported clinical signs in mullet (*Liza auratus*).

Based on biochemical and genomic analyses in cell cultures, Hedge et al. (2003) attempted to identify a virus isolated from a diseased guppy (*Poecilia reticulata*) kept in a freshwater aquarium. These researchers confirmed the presence of a *Noda* virus strain belonging to the RGNNV group, with antigenic similarity to marine *Noda* virus isolates. *Noda* virus identification via PCR did also succeed in diseased sea bass originating from two different intensive culturing freshwater systems (Athanassopoulou et al., 2003) and in intensively cultured sturgeons (Athanassopoulou et al., 2004).

In the present study, the isolation by using the continuous SSN-1 cell line and genetic characterisation of *Noda* virus, from sea bass reared both in sea and fresh water facilities, was realised for the first time in Greece.

από δύο διαφορετικά εντατικά συστήματα εκτροφής σε γλυκό νερό (Athanassopoulou et al., 2003) και σε εντατικά εκτρεφόμενους οξύρρυγχους (Athanassopoulou et al., 2004).

Στην παρούσα εργασία περιγράφεται, για πρώτη φορά στη χώρα μας, η απομόνωση του ιού *Noda* στη συνεχή κυτταρική σειρά SSN-I και η μοριακή ταυτοποίησή του από λαβράκια ελληνικών εκτροφών γλυκού και θαλασσινού νερού.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Δειματοληψία και Κλινική Εικόνα

1. Λαβράκια εκτρεφόμενα σε γλυκό νερό

Τα λαβράκια που εξετάστηκαν προέρχονταν από μονάδα ιχθυοκαλλιέργειας της Ηπείρου. Οι ιχθύες, όταν ζύγιζαν 1,5 γρ., μεταφέρθηκαν από το θαλασσινό ιχθυογεννητικό σταθμό στη μονάδα, όπου παρέμειναν σε κλειστό και ανοιχτό σύστημα εκτροφής με νερό γεώτρησης, αλατότητας 0‰ και pH 7.8, καθ' όλον τον παραγωγικό τους κύκλο.

Κατά τη μετάβαση σε γλυκό νερό, η θνησιμότητα ήταν περιορισμένη. Οι ιχθύες παρέμειναν σε γλυκό νερό για περίπου 8 μήνες, όταν εκδηλώθηκαν τα πρώτα κλινικά συμπτώματα. Τα περιστατικά παρατηρήθηκαν το καλοκαίρι του 2002, όταν η θερμοκρασία του νερού ήταν περίπου 25-28°C και διήρκησαν ένα μήνα. Την περίοδο εκείνη, οι ιχθύες είχαν βάρος 50-80 γρ. και διατηρούνταν σε κλειστό κύκλωμα εκτροφής. Τα συμπτώματα που εμφάνισαν ήταν νευρικής φύσεως, όπως: ανώμαλη κολύμβηση, υπερευαισθησία, θόλωση του κερατοειδούς και αιμορραγία των οφθαλμών, τύφλωση, σκούρος χρωματισμός δέρματος και τραυματικές αλλοιώσεις. Οι δερματικές αλλοιώσεις επιπλέκονταν συχνά από μυκητιάσεις. Η ημερήσια θνησιμότητα έφτασε μέχρι 30%.

Τα λαβράκια, που διατηρούνταν στο ανοιχτό κύκλωμα εκτροφής, εμφάνισαν πιο ήπια συμπτώματα, με περισσότερο έκδηλες τις οφθαλμικές αλλοιώσεις.

2. Λαβράκια εκτρεφόμενα σε μονάδες θαλασσινού νερού.

Τα λαβράκια που εξετάστηκαν προέρχονταν από κλωβούς τριών μονάδων ιχθυοκαλλιέργειών της Ηπείρου και είχαν βάρος 2-7γρ., όταν άρχισαν να εμφανίζουν νευρικά συμπτώματα. Τα περιστατικά συνέβησαν το καλοκαίρι του 2002, όταν η θερμοκρασία του νερού ήταν περίπου 25-27°C και διήρκησαν περίπου δύο μήνες. Την περίοδο εκείνη, οι ιχθύες και των τριών μονάδων εμφάνισαν ανάλογα νευρικά συμπτώματα που περιγράφηκαν παραπάνω, βαρύτερης όμως μορφής. Η ημερήσια θνησιμότητα κυμάνθηκε από 10- 30%.

MATERIALS AND METHODS

Fish sampling and Clinical Evaluation

1. Sea bass reared in freshwater hatcheries

Examined sea bass were artificially reared in freshwater in a commercial hatchery situated in Epirus. Fishes were transported from a marine hatchery to the farm, when they weighed 1.5 g and were thereafter reared in well water in open-flow system facilities at a salinity 0‰ and pH of 7.8 throughout the rest of their life. During the freshwater transition, mortality was low. Fishes were held in freshwater for almost 8 months, when the first clinical signs appeared. The outbreak was held in summer 2002, when water temperature was 25-28°C, and it lasted for one month period. At that time, sea bass, reared in the re-circulated system, weighted approximately 50-80g and showed the succeeding nerve symptoms: sluggish swimming, oversensitivity, retinopathy, eye bleeding, blindness, dark skin coloration and traumatic lesions. The skin lesions were often contaminated with pathogenic fungi. Daily mortality reached total 30% (during the outbreak period). Sea bass reared in open-flow systems, exhibited less severe symptoms of the disease, with more profound eye lesions.

2. Sea bass reared in marine hatcheries

Examined sea basses originated from cages of 3 fish farms in Epirus region and were weighting 2-7 g, when neural symptoms appeared. Outbreak was held in summer 2002, when water temperature was about 25-27°C and lasted for two months. During that period, fish from all three farms showed major neurological symptoms, like sluggish swimming, oversensitivity, retinopathy, eye bleeding, blindness, dark skin coloration and traumatic lesions. Daily mortality was about 10-30%.

Microbiological and parasitological examination

The minimum number of fish examined per farm (1 freshwater and 3 seawater cages) was 10 individuals. Kidney and spleen samples were inoculated onto Tryptone Soy Agar (TSA) and Thiosulphate Citrate Bile Salt Agar (TCBS) for bacteriological use, according to the methods described by Roberts and Shepherd (1997). Squash imprints of gill, skin, gall bladder, liver, spleen, kidney, muscle, brain and gut tissue from freshly sacrificed fish, were examined for the presence of parasites, according to the methods described by Roberts (1989) and Athanassopoulou (1990). At the same time, ten (10) eye and brain samples from symptomatic sea bass were collected for subsequent tissue cultures and PCR analysis.

Μικροβιολογική και παρασιτολογική εξέταση

Ο ελάχιστος αριθμός ιχθύων που εξετάστηκαν ανά μονάδα (1 γλυκού νερού και 3 με θαλασσινούς κλωβούς) ήταν 10 άτομα. Τα δείγματα εξετάστηκαν για την παρουσία των γνωστών παθογόνων βακτηρίων των ψαριών και για εξωπαράσιτα.

Δείγματα σπλήνα και νεφρού, από ιχθύες εκτροφών τόσο του γλυκού όσο και του θαλασσινού νερού, ενοφθαλμίστηκαν σε τρυπτονικό άγαρ σόγιας (TSA) και θειοσουλφιδικό κιτρικό άγαρ με άλας και χολή (TCBS), σύμφωνα με τη βακτηριολογική μέθοδο που περιγράφεται από τους Roberts και Shepherd (1997). Εντυπώματα βράγχιων, δέρματος, ουροδόχου κύστης, ήπατος, μυών, εγκεφαλικού και εντερικού ιστού, εξετάστηκαν για την παρουσία παρασίτων, σύμφωνα με τις μεθόδους που περιγράφονται από τους Roberts (1989) και Athanassopoulou (1990). Παράλληλα, συλλέχθηκαν δέκα δείγματα εγκεφάλου και οφθαλμών από συμπτωματικά λαβράκια, βάρους 80 γρ., που προορίζονταν για απομόνωση του ιού σε κυτταροκαλλιέργειες και για ανίχνευση αυτού με τη μέθοδο της nested RT-PCR.

Απομόνωση του ιού

Δείγματα εγκεφάλου και οφθαλμών των προσβεβλημένων λαβρακιών, απ' όλες τις υπό εξέταση μονάδες, ομογενοποιήθηκαν μετά από προσθήκη EMEM (Eagle's Medium Essential Medium) και ρυθμιστικού διαλύματος αλάτων, εμπλουτισμένου με 2% ορό εμβρύου μόσχου, με 0,85% NaHCO₃, (100 IU/ml) πενικιλίνης, (100 μg/ml) στρεπτομυκίνης και (0,25 μg/ml) αμφοτερικίνης Β. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 1500 rpm για 15 λεπτά, στους 4 °C.

Έγινε τελική αραιώση 1:10 του αρχικού εναωρήματος και ακολούθησε διήθηση με αποστειρωμένα φίλτρα, οπών διαμέτρου 0,45μm (Santorius, Minisart, Germany), ώστε να αποτραπεί η επιμόλυνση με βακτήρια. Το εναίωμα ενοφθαλμίστηκε σε μικροπλάκες 24ωρων θέσεων (Nunc, Denmark), που έφεραν κύτταρα της συνεχούς κυτταρικής σειράς SSN-1 και ακολούθησε επώαση στους 25 °C, για τουλάχιστον 7 – 12 ημέρες. Για κάθε δείγμα ιστών πραγματοποιήθηκαν τρεις τουλάχιστον τυφλές διόδοι. Οι καλλιέργειες ελέγχονταν καθημερινά για την παρουσία κενотоπιών στα κύτταρα και εκφύλισης, ενδεικτικών του κυτταροπαθογόνου αποτελέσματος (Εικόνα 1, 2).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Μικροβιολογική και παρασιτολογική εξέταση

Μικροβιολογικές και παρασιτολογικές αναλύσεις, που έγιναν σε 10 λαβράκια από κάθε σύστημα εκτροφής, έδωσαν αρνητικά αποτελέσματα.

Virus isolation

Brain and eye samples from infected sea bass of all affected farms, 10 individuals per farm, were collected and homogenized after adding EMEM (Eagle's Medium Essential Medium) and a buffer solution supplemented with 2% FCS (Foetal Calf Serum), 0,85% NaHCO₃ and antibiotics [Penicillin (100 IU/ml), streptomycin (100μg/ml) and amphotericin B (0.25 μg/ml)]. After centrifugation at 1500 rpm for 15 min. at 4 °C, the samples were further diluted in medium to provide a 1:10 dilution of the original tissue sample and were filtered through 0.45μm sterile filters (Santorius, Minisart, Germany). The filtered tissue extracts were inoculated in continuous SSN-1 cell line in 24-well microplates (Nunc, Denmark) and were incubated at 25 °C, for at least 7-12 days. Three blind passages were performed for each sample. Cultures were checked daily for the presence of intracytoplasmic vacuoles, indicating cytopathic effect (Figures 1, 2).

RESULTS

Microbiological and parasitological analysis

Microbiological and parasitological analyses were performed in 10 specimens of diseased sea bass in each culture system and were found negative.

Virus Isolation

From all tested samples showed cytopathic effects, *Noda* virus was isolated and this strain led to the characterization of the Greek EXF 1 *Noda* virus isolate and stock it.

1. *Noda* virus RNA isolation

Viral RNA extraction from infected tissues and SSN-I cells affected was carried using the QIAamp Viral RNA Mini Spin Kit (Quiagen GmbH, Holden, Germany), according to the manufacturers' instructions. The resulting 50μl RNA product was electrophoretically examined for its integrity and quantity.

2. PCR primers

The initial PCR-primer set, used for the amplification of the 725 bp coat protein gene region, was synthesized according to the published viral nucleotide sequence of the coat protein gene of SJNNV (Nishizawa et al., 1994). Primer F (5'- GAATCTTCCAGCGATAC -3') consisted of 17 nucleotides complementary to nt 306–322 and primer R (5'- CGAGTCAACACGGGTGAAGA -3') of 20 nucleotides corresponding to nt 1011–1030 of the SJNNV coat protein. The forward and reverse primer for the nested PCR, which amplified a 255 bp fragment, were NF (5'- AATGTGCCCGCAAACAC -3') and NR (5'- GACACGTTGACCACATCAGT -3'), (Table 1).

Απομόνωση του ιού σε κυτταροκαλλιέργειες

Όλα τα υπό εξέταση δείγματα λαβρακιών εμφάνισαν κυτταροπαθολόγο αποτέλεσμα (ΚΠΑ) (Εικόνα 1, 2) μέσα στο παραπάνω χρονικό διάστημα των διόδων στα κύτταρα της κυτταρικής σειράς SSN-1. Ελάχιστα δείγματα (2) εμφάνισαν ΚΠΑ από την πρώτη δίοδο, περισσότερα (5) από τη δεύτερη και όλα τα υπόλοιπα από την τρίτη. Η απομόνωση του ιού *Noda* επέτρεψε το χαρακτηρισμό του ελληνικού στελέχους EXF 1 και την αποθεματοποίησή του ("ιός stock").

Ανίχνευση του ιού *Noda* και μοριακός χαρακτηρισμός του γενώματος του ιού με nested RT-PCR

1. Απομόνωση του ιικού RNA

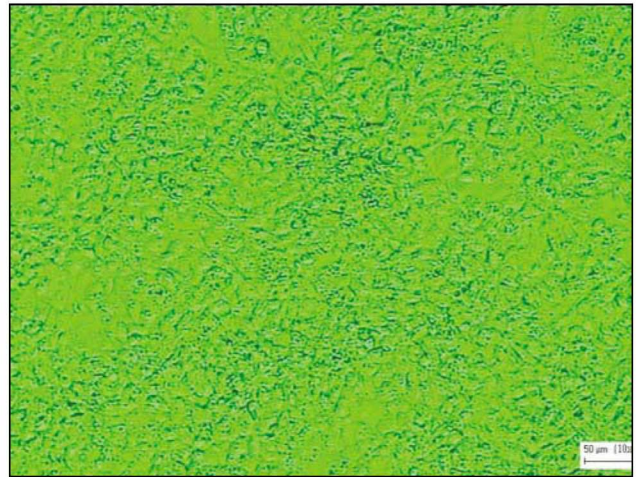
Η εκχύλιση του ιικού RNA, από τα δείγματα ιστών των μολυσμένων λαβρακιών και από τα ενοφθαλμισμένα κύτταρα SSN-1, όπου απομονώθηκε το EXF1, έγινε με την χρήση του *QIAamp Viral RNA Mini Spin Kit* (Qiagen GmbH, Holden, Germany), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Το ιικό RNA που εκχυλίστηκε είχε όγκο 50μl και ελέγχθηκε, αναφορικά στην ακεραιότητα και την ποσότητα του, με τη χρήση οριζόντιας ηλεκτροφόρησης.

2. Εκκινητές

Η επιλογή του αρχικού εκκινητή της Αλυσιδωτής Αντίδρασης της Πολυμεράσης (ΑΑΠ, PCR), που χρησιμοποιήθηκε για τον εντοπισμό της ειδικής περιοχής των 725 ζβ της πρωτεΐνης του περιβλήματος του ιού, βασίστηκε στη δημοσιευμένη αλληλουχία νουκλεοτιδίων της πρωτεΐνης της θήκης του γενώματος του SJNNV (Nishizawa et al., 1994). Αυτός ήταν ο εκκινητής F (5'-GAATCTTCCAGCGATAC-3'), που αποτελείται από 17 νουκλεοτίδια συμπληρωματικά στο nt 306–322 και ο εκκινητής R (5'-CGAGTCAACACGGGTGAAGA-3'), που αποτελείται από 20 νουκλεοτίδια για το nt 1011–1030 της SJNNV πρωτεΐνης της θήκης. Η αλληλουχία του θετικής φοράς και του αρνητικής φοράς εκκινητή για την ένθετη ΑΑΠ ενός 255 ζβ τμήματος (Dalla Valle et al., 2001) είναι για τον NF (5'-AATGTGCCCGCAAACAC-3') και για τον NR (5'-GACACGTTGACCACATCAGT-3') (Πίνακας 1).

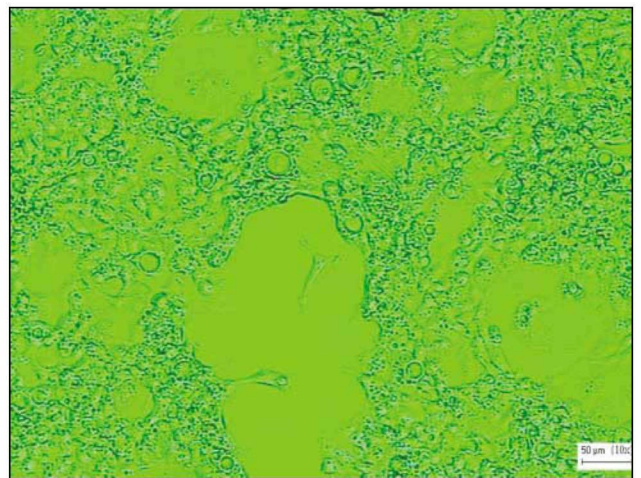
3. Ανάστροφη αντιγραφή

Το ιικό RNA αναμείχθηκε σε αναλογία 0,5μg R εκκινητή ανά μg RNA σε τελικό όγκο 11μl, μετά από προσθήκη νερού υγρής χρωματογραφίας. Ακολούθησε επώαση στους 70°C για 5 λεπτά και αμέσως μετά παραμονή του διαλύματος σε πάγο για 5 επιπλέον λεπτά. Η διαδικασία της ανάστροφης αντιγραφής ξεκίνησε με την προσθήκη 20 μονάδων AMV ανάστροφης αντιγραφής (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) σε μίγμα αντίδρασης όγκου 20 μl, που περιείχε 50 mM Tris-HCl



Εικόνα 1. Φυσιολογικά κύτταρα της κυτταρικής σειράς SSN-1. Μεγέθυνση 200 X.

Figure 1. Normal SSN-1 cell line (Invertoscope, 200 X magnification).



Εικόνα 2. Κυτταροπαθολόγος δράση (ενδοπλασματικά κενोटόπια και αρχόμενη εκφύλιση) του ιού *Noda* στην ενοφθαλμισμένη με παθολογικό υλικό κυτταρική σειρά SSN-1 σε ανάστροφο μικροσκόπιο (200X).

Figure 2. Cytopathic effect after inoculation of *Noda* virus positive pathological material in continuous SSN-1 cell line. Typical intracytoplasmic vacuolation and degeneration was observed under Invertoscope (200 X magnification).

3. Reverse Transcription

Extracted RNA was mixed with R-primer in a ratio of 0.5 μg primer DNA per μg RNA in a total volume of 11 μl, after adding high purity water, followed by incubation at 70°C for 5 min and direct contact with ice for 5 min. Reverse transcription was initiated by adding 20 units of AMV reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) to a reaction mixture of 20 μl, containing 50 mM Tris-HCl pH 8.3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM

Πίνακας 1. Ζεύγη εκκινητικών μορίων για τη nested RT-PCR

ΠΕΡΙΟΧΗ ΣΤΟΧΟΣ	ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ (5'→3')	ΘΕΣΗ ΣΤΟ ΓΕΝΩΜΑ	ΜΕΓΕΘΟΣ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ (ξβ)	ΒΙΒΛΙΟΓΡ. ΑΝΑΦΟΡΑ
SJNNV πρωτεΐνη του περιβλήματος του ιού	F: -GAATCTTCCAGCGATAC-	306-322	725	Nishizawa et al., 1994
	R: -CGAGTCAACACGGGTGAAGA-	1011-1030		
	NF:-AATGTGCCCCGCAAACAC-	547-565	255	Dalla Valle et al., 2001
	NR:-GACACGTTGACCACATCAGT-	782-802		

Table 1. Primer's sequence

TARGET REGION	PRIMERS (5'→3')	POSITION	AMPLICON SIZE (bp)	REFERENCE
SJNNV protein of the viral coat	F: -GAATCTTCCAGCGATAC-	725	306-322	Nishizawa et al., 1994
	R: -CGAGTCAACACGGGTGAAGA-		1011-1030	
	NF:-AATGTGCCCCGCAAACAC-	255	547-565	Dalla Valle et al., 2001
	NR:-GACACGTTGACCACATCAGT-		782-802	

pH 8.3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM DTT και 30 μονάδες αναστολέα της ριβονουκλεάσης (RNaseOUT, Invitrogen). Το παραπάνω μίγμα επώαστηκε στους 42 °C για 90 λεπτά για τη σύνθεση του cDNA.

4. Αλυσιδωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης (ΑΑΠ)

Μετά τη σύνθεση του cDNA, ακολούθησε η αντιγραφή της γενωμικής περιοχής στόχου του ιού της ΙΕΑ (Πίνακας 1), με τη μέθοδο της one tube- nested PCR, σύμφωνα με προκαθορισμένο πρωτόκολλο (Sambrook et al., 1989). Το μίγμα της αντίδρασης προθερμάνθηκε στους 94 °C για 3 λεπτά και μετά υποβλήθηκε σε 40 κύκλους, που ο καθένας περιελάμβανε τα παρακάτω στάδια: 94 °C για 30 sec, 50 °C για 30 sec και 72 °C για 40 sec. Το τελικό στάδιο επέκτασης έγινε στους 72 °C για 10 λεπτά. Τα προϊόντα της PCR αναλύθηκαν μέσω ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης 2%, αφού προηγουμένως βιάστηκε με την ειδική χρωστική βρωμιούχο αιθίδιο (0.5 μg/ml). Χρησιμοποιήθηκε δείκτης μοριακών βαρών, με πρότυπο ανά 100 ξβ (Gibco, BRL) και μετά την ηλεκτροφόρηση το πήκτωμα της αγαρόζης αναλύθηκε σε υπεριώδες φως.

5. Ανάλυση της νουκλεοτιδικής ακολουθίας του ιικού RNA

Μετά από απομόνωση του προϊόντος της nested PCR με τη βοήθεια του εμπορικού kit NucleoSpin Extraction (Macherey & Nagel), αυτό εντέθηκε στον πλασμιδιακό φορέα κλωνοποίησης Topo-TA (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) με χρήση του ενζύμου T4 DNA ligase (New England BioLabs) και ακολούθησε μετασχηματισμός επιδεικτικών κυττάρων *E. coli*. Τα πλασμίδια των βακτηριακών αποικιών απομονώθηκαν με το Plasmid Mini Prep kit (Roche) και ο προσ-

DTT και 30 units of ribonuclease inhibitor (RNaseOUT, Invitrogen). For cDNA synthesis the above reaction mixture was incubated for 90 min at 42 °C.

4. Polymerase Chain Reaction (PCR)

After cDNA synthesis, one -tube nested PCR followed for the selected IEA virus target-region, according to a standard protocol (Sambrook et al. 1989). The reaction mixture was preheated to 94 °C for 3 min. and then subjected to 40 thermal cycles, of 94 °C for 30 sec, 50 °C for 30 sec and 72 °C for 40 sec. The final extension step was at 72 °C for 10 min. PCR products were analyzed on a 2% agarose gel, stained with ethidium bromide (0.5 μg/ml). A 100 bp DNA ladder (Gibco, BRL) served as a size marker and gel was photographed under UV.

5. Nucleotide sequence analysis of the viral RNA

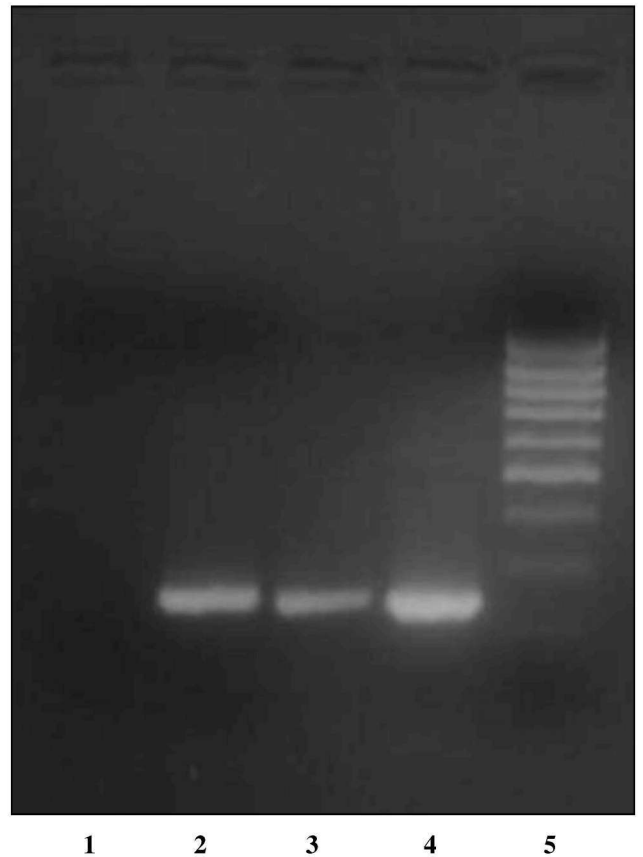
Agarose gel extraction of PCR amplicon (NucleoSpin Extraction kit, Macherey & Nagel), in order to insert into the Topo-TA plasmid cloning vector (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) using T4 DNA ligase (New England BioLabs), was followed by transformation of competent *E. coli* cells. Obtained plasmids were purified using the Plasmid Mini Prep kit (Roche) and sequenced by the dideoxy method on a LI-Cor 4200 automated sequencer (LI-Cor Inc., Lincoln, NE, USA), using M13 forward (-20) (5'-GTAAAACGACGGCCAG-3') and M13 reverse (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3') primers. *In silico* analysis of the determined sequences were performed using BLAST computer program (Altschul et al. 1990; ncbi.nlm.nih.gov: 80/cgi-bin/BLAST/nph-blast).

διορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των ενθεμάτων διενεργήθηκε με τη μέθοδο διδεοξυ τετρατισμού της πολυμεράσης (dideoxy sequencing) σε αυτόματο αναλυτή LI-Cor 4200 (Li-Cor Inc., Lincoln, NE, USA) με χρήση των εκκινητών M13 forward (-20) (5'-GTAAAACGACGGCCAG-3') και M13 reverse (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'). Η *in silico* επεξεργασία των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών που προέκυψαν έγινε με τη βοήθεια του λογισμικού BLAST (Altschul et al. 1990; ncbi.nlm.nih.gov: 80/cgi-bin/BLAST/nph-blast).

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η ταξινόμηση του ιού *Noda* των ιχθύων έχει προταθεί από τους Nishizawa et al. (1994), βασιζόμενη στην ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του γονόματός της πρωτεΐνης του περιβλήματος του ιού, μετά από 25 διαφορετικές απομονώσεις, προερχόμενες από ιαπωνικές, ταϊλανδέζικες, αυστραλιανές και ιταλικές εκτροφές ιχθύων. Σύμφωνα με το φυλογενετικό δέντρο που προέκυψε, οι ιοί *Noda* των ιχθύων χωρίστηκαν σε τέσσερις ομάδες: tiger puffer nervous necrosis virus (TPNNV), striped jack NNV (SJNNV), berfin flounder NNV (BFNNV) και red - spotted grouper (RGNNV). Οι Dalla Valle et al. (2001) αναφέρουν ότι οι ιοί *Noda*, που απομονώθηκαν στη Μεσόγειο, ανήκουν στην ομάδα των red-spotted grouper (RGNNV), όπου ανήκουν και τα στελέχη των δικών μας απομονώσεων.

Σε αντίθεση με τα ευρήματα αυτά, συγγραφείς (Thiery et al., 1999β) αναφέρουν δύο απομονώσεις του



Εικόνα 3. Ανίχνευση ιϊκού RNA με nested RT-PCR. Θέση 1: αρνητικός μάρτυρας, Θέση 2 ~ 4: εγκέφαλοι ιχθύων, Θέση 5: Δείκτης μοριακών βαρών (100-1000 ζβ).

Figure 3. Nested RT-PCR from RNA extracted from brain of affected fish. 1: negative control (no DNA template), 2 ~ 4: Nested PCR fragments of *Noda* virus isolates from sea bass, 5: 100bp DNA ladder, molecular weight marker (100-1000 bp).

```

1  AATGTGCCCCGCAAACACGGGCGGTGGTTACGTTGCTGGCTTCCTGCCTGATCCAACTGA
1  M C P A N T G G G Y V A G F L P D P T D
61  CAACGATCACACCTTCGACGCGCTTCAAGCAACTCGTGGTGCAGTCGTTGCCAAATGGTG
21  N D H T F D A L Q A T R G A V V A K W W
121 GGAAAGCAGAACAGTCCGACCACAGTACACCCGTACGCTCCTCTGGACCTCGTCGGGAAA
41  E S R T V R P Q Y T R T L L W T S S G K
181 GGAGCAGCGTCTCACGTACCTGGTCGGCTGATACTCCTGTGTGTGTCGGCAACAACACTGA
61  E Q R L T S P G R L I L L C V G N N T D
241 TGTGGTCAACGTGTC
81  V V N V

```

Εικόνα 4. Η μεγέθους 255 ζβ νουκλεοτιδική και η αντίστοιχη αμινοξική αλληλουχία (σημειωμένη με έντονης γραφής αλφαβητικούς χαρακτήρες) του κλωνοποιημένου τμήματος του ιού *Noda* από τη γενωμική περιοχή της πρωτεΐνης του καψιδίου. Η αρίθμηση των νουκλεοτιδίων και των αμινοξέων φαίνεται στα αριστερά, ενώ είναι υπογραμμισμένες οι θέσεις των εκκινητών της ένθετης AAI (nested PCR).

Figure 4. The 255-bp nucleotide and corresponding amino acid sequence (denoted by bold face type one-letter designation) of the amplified and cloned region of the *Noda* virus coat protein gene. Nucleotide and amino acid numbering are shown on the left and nested PCR-primer positions are underlined.

ιού (μία από τον Ατλαντικό Ωκεανό και μία από τη Μεσόγειο Θάλασσα), που προκαλούν τα ίδια συμπτώματα όταν προσβάλλουν λαβράκια. Οι εν λόγω απομονώσεις έχουν γενωμικές διαφορές και για το λόγο αυτό υπήρξαν διαφωνίες για το αν υπάρχει φράγμα μετάδοσης του ιού μεταξύ των ειδών. Αυτό αποδείχθηκε, επίσης, από τους Ucko και συν. (Ucko et al., 2004) από απομονώσεις στο Ισραήλ, όπου δεν υπήρχε εμφανής εξειδίκευση σε ξενιστή. Μετάδοση της νόσου παρατηρήθηκε, επίσης, σε τσιπούρες (Castrì et al., 2001), που μπορεί να είναι ασυμπτωματικοί φορείς, καθώς και σε λαβράκια (Le Breton et al., 1996). Είναι προφανές, επομένως, από μοριακές μελέτες και διασταυρούμενες μολύνσεις, ότι μερικά στελέχη/ είδη του ιού *Noda* δεν παρουσιάζουν αυστηρή εξειδίκευση σε ξενιστή, όπως επίσης και κάποιοι ξενιστές δεν είναι ευπαθείς σε ένα στέλεχος/ είδος του ιού (Munday et al., 2002).

Προηγούμενες μελέτες από τους Athanassopoulou et al. (2003) έδειξαν την παρουσία του ιού *Noda* που μπορεί να προσβάλει λαβράκια του γλυκού νερού, προκαλώντας νόσο με νευρικά συμπτώματα. Στο συγκεκριμένο περιστατικό, ο χρόνος μόλυνσης δεν μπορεί να προσδιοριστεί, όμως είναι πιθανόν τα λαβράκια, που εκτρέφονταν στην ίδια μονάδα, να εκτέθηκαν στον ιό όταν ακόμη βρισκόνταν στο θαλάσσιο ιχθυογεννητικό σταθμό. Τα λαβράκια παρουσίασαν έντονα κλινικά συμπτώματα τουλάχιστον οκτώ (8) μήνες μετά την εισαγωγή τους στο γλυκό νερό (Athanassopoulou et al., 2003). Μετά ο ιός πέρασε σε νέο ξενιστή, στον οξύρρυγχο, όπου συνέχισε να πολλαπλασιάζεται (Athanassopoulou et al., 2004). Έχει δειχθεί ότι ο ιός διατηρείται σε γλυκό νερό, σε συνθήκες εργαστηρίου, είναι λιγότερο σταθερός και δεν επιβιώνει έξι μήνες μετά την αποθήκευσή του (Frerichs et al., 2000).

Στην παρούσα μελέτη, τα λαβράκια που εκτρέφονταν σε γλυκό νερό παρουσίασαν κλινικά συμπτώματα τουλάχιστον μετά από οκτώ μήνες και ο ιός παρέμεινε μολυσματικός σε γλυκό νερό για πολύ μεγαλύτερη περίοδο, προσβάλλοντας διαφορετικούς ιχθύες-ξενιστές.

Παρότι ο ιός έχει μελετηθεί ικανοποιητικά σε θαλάσσια είδη ιχθύων, ωστόσο, είναι αναγκαίο να διεξαχθούν περαιτέρω μελέτες για να εξακριβωθεί η μεταδοτικότητά του υπό διαφορετικές αλατότητες. Επιπλέον, υπάρχει ελλιπής πληροφόρηση σχετικά με τις φυσικές οδούς μόλυνσης των *Betanodaviruses*, ενώ η πιθανότητα ύπαρξης ασυμπτωματικών φορέων που διασπείρουν τον ιό δεν έχει ακόμα μελετηθεί σε ικανοποιητικό βαθμό. Επομένως, οι τομείς αυτοί χρήζουν περαιτέρω διερεύνηση.

DISCUSSION

A classification of fish *Noda* viruses has been proposed by Nishizawa et al., (1994) based on the nucleotide sequence analysis of the coat protein gene from 25 distinct isolates from Japan, Thai, Australian and Italian fish farms. According to the resulting phylogenetic tree, fish *Noda* viruses were divided into the following four groups: tiger puffer nervous necrosis virus (TPNNV), striped jack NNV (SJNNV), berfin flounder NNV (BFNNV) and red – spotted grouper (RGNNV). Dalla Valle et al. (2001) reported that all Mediterranean *Noda* isolates are clustered in the group of red-spotted grouper (RGNNV), where our isolates also aggregate. In contrast to these findings, Thiery et al. (1999b) have reported the presence of two virus isolates (one from the Atlantic Ocean coast and the other from the Mediterranean Sea), which causes similar signs when affecting sea bass. Since the above isolates have distinct genomes, the hypothesis that the virus has no species barrier, can be accepted. This was also confirmed by Ucko et al. (2004) in Israel, where no host specificity was evident in the virus isolates.

Transmission of the disease has been reported in sea bass and sea bream (Castrì et al., 2001), which is normally an asymptomatic carrier (Le Breton et al., 1997). Thus, it is apparent from molecular and cross infection studies that some *Noda* virus strains/species do not exhibit strict host specificity nor are some hosts only susceptible to one strain/species (Munday et al., 2002).

It is worth noticing that in a previous study the presence of a *Noda* virus agent, which can infect sturgeon in freshwater causing disease with neurological signs, has been demonstrated (Athanassopoulou et al., 2003). The time of the first infection could not be definitely demonstrated, but it is possible that sea bass, reared in the same farm, got contact with virus, when lived in the marine hatchery. Sea bass showed clinical signs at least eight (8) months after introduction to freshwater (Athanassopoulou et al., 2003). Afterwards, the virus passed horizontally to sturgeon, where it continued to replicate (Athanassopoulou et al., 2004). *Noda* virus, held in freshwater under laboratory conditions, has been shown to be less stable and, according to Frerichs et al. (2000), no-viable virus could be detected after six months storage. In our case, fish developed clinical signs of the disease after more than eight (8) months and the virus continued to remain infective for a longer period in freshwater clinically, infecting also various piscine hosts.

Although the virus has been well studied in marine fish, further research is necessary in order to clarify viral transmission under different salinity conditions.

Ευχαριστίες

Η παρούσα έρευνα χρηματοδοτήθηκε εν μέρει από τη ΓΓΕΤ, στα πλαίσια της ελληνο-γερμανικής συνεργασίας 2002-2005. □

There is also lack of information on the natural routes of transmission of *Betanodaviruses* and the possibility of unapparent carriers shedding virus. These aspects require further investigation.

Acknowledgements

Present work was partly supported by General Secretariat for Research and Technology, Hellenic Ministry of Development, in the framework of the Greek-German scientific collaboration program 2002-2005. □

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ - REFERENCES

- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W. and Lipman D. J., 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215, 403-410.
- Athanassopoulou F., 1990. A study of the Myxosporcan infections of *R. rutilus* L. with special reference to *Myxidium rhodei* Leger, 1905 in the renal tissue. Ph.D. Thesis, University of Stirling.
- Athanassopoulou F., Billinis C., Prapas Th., 2004. Important disease conditions of new cultured species (*Acipenser. gueldestaedi*, *Mugil* sp., *Dicentrarchus labrax* and *Silurus* sp., *Oreochromis* sp.) in intensive freshwater farming conditions in Greece: First incidence of Noda virus infection in *Acipenser* sp. *Diseases of Aquatic Organisms*, 60, 241-246.
- Athanassopoulou F., Billinis C., Psychas V., Karipoglou K., 2003. Viral encephalopathy and retinopathy of *Dicentrarchus labrax* L. farmed in freshwater in Greece. *Journal of Fish Diseases* 26, 361-365.
- Bovo G., Nishizawa T., Maltese C., Borghesan F., Multinelli F., Montesi F, De Mas S., 1999. Viral encephalopathy and retinopathy of farmed marine fish species in Italy. *Virus Research* 631, 43-146.
- Breuil G., Mouchel O., Fauvel C., Pepin JF. 2001. Sea bass *Dicentrarchus labrax* nervous necrosis virus isolates with distinct pathogenicity to sea bass larvae. *Diseases of Aquatic Organisms* 45 (1), 25-31.
- Castri J., Thiery R., Jeffroy J., de Kinkelin P., Raymond J.C. 2001. Sea bream *Sparus aurata*, an asymptomatic contagious fish host for noda virus. *Diseases of Aquatic Organisms* 47 (1), 33-38.
- Comps M., Pepin J.F., Bonami J.R., 1994. Purification and characterization of two fish encephalitis viruses (FEV) infecting *Lates calcarifer* and *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture*, 123, 1-10.
- Dalla Valle L., Negrisol E., Patarnello P., Zanella L., Maltese C., Bovo G., Colombo L. 2001. Sequence comparison and phylogenetic analysis of fish nodaviruses based on the coat protein gene. *Archives of Virology* 146, 1125-1137.
- Dendrinou P., Thorpe P., 1985. Effects of reduced salinity on growth and body composition in the European bass *D. labrax*. *Aquaculture* 49, 333-358.
- Drury R.A., Wallington E.A. (Eds) 1980. Carleton's histological Techniques, 5th Edition Oxford University Press, Oxford. 520pp.
- Fotis G., 1999. *Fish Pathology and Aquaculture*. Vol. I. Current education editions, Thessaloniki. 382pp.
- Frerichs G. N., Tweedie A., Starkey W. G., Richards R. H., 2000. Temperature, pH and electrolyte sensitivity and heat, UV and disinfectant inactivation of sea bass *D. labrax* neuropathy nodavirus. *Aquaculture* 185, 13-24.
- Hedge A., The HC., Lam TJ., Sin YN. (2003). Nodavirus infection in freshwater ornamental fish, guppy, *Poecilia reticulata*-comparative characterization and pathogenicity studies. *Arch Virol*, 10, 1007-1019.
- Iwamoto T., Mori K., Arimoto M. Nakai T., 1999. High permissivity of the fish cell line SSN-1 for piscine nodaviruses. *Diseases of Aquatic Organisms* 39 (1), 37-47.
- Jalil J., D. Gomez, T. Nakai, I. Sharifpour, C. Shau-Chi, M. Soltani, M. Sharif, Rohani and A. Saidi. (2004): Virology, molecular biology and histopathology investigations on mortality of wild golden grey mullet (*Liza-auratus*) in Iranian waters of Caspian Sea. In press.
- Kaesbergh P., 1987. In: Rowlands D.J., Mayo M.A., Mahy B.W.J.(Eds.), *Molecular Biology of Positive Strand RNA Virus*, Academic Press, London, 207-218.
- Le Breton et al., 1996 A., Grisez L., Sweetman J., Ollevier F., 1996. Viral nervous necrosis (VNN) associated with mass mortality in cage reared sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *J. Fish Dis.* 20, 145-151.
- Mori K., Nakai T., Muroga K., Arimito M., Mushiaki K., Furusawa I., (1992). Properties of a new virus belonging to nodaviridae found in larval striped jack *Pseudocaranx dentex* with nervous necrosis. *Virology* 187, 368-371.
- Munday BL., Kwang J. & Moody N., 2002. Betanodavirus infections of teleost fish: a review. *Journal of Fish Diseases* 25, 127-142.
- Nagai T., Nishizawa T., 1999. Sequence of the non-structural protein gene encoded by RNA 1 of striped jack nervous necrosis virus. *J. Gen. Virol.* 80, 3019-3022.
- Nishizawa T., Mori K., Nakai T., Muroga K., 1994. Polymerase chain reaction (PCR) amplification of RNA of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV). *Diseases of Aquatic Organisms* 18, 103-107.
- Roberts R.J., 1989. *Fish Pathology*. Bailliere-Tindall. London. 467pp
- Roberts R.J., Shepherd C.J., 1997. *Handbook of trout and salmon diseases*. Fishing News Books, Oxford. 179pp.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T., 1989. *Molecular cloning*. In: *A Laboratory Manual*, Second Ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Skliris G.P., Kroniris J.V., Sideris D.C., Shinn A.P., Starkley W.G., Richards R.H., 2001. Phylogenetic and antigenic characterization of new fish nodavirus isolates from Europe and Asia. *Virus Research* 75 (1), 59-67.
- Thiery R., Raymond J.C., Castri J., 1999a. Natural outbreak of viral encephalopathy and retinopathy in juvenile sea bass *Dicentrarchus labrax*: study by nested reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Virus Research* 63, 11-17.
- Thiery R., Arnauld C., Delsert C. 1999b. Two isolates of sea bass *D. labrax*, nervous necrosis virus with distinct genomes. *J. Fish Dis.* 22: 201-207.
- Ucko M., Colomi A., Diamant A., 2004. Nodavirus infections from Israeli mariculture. *Journal of Fish Diseases* 27 (8), 459- 469.