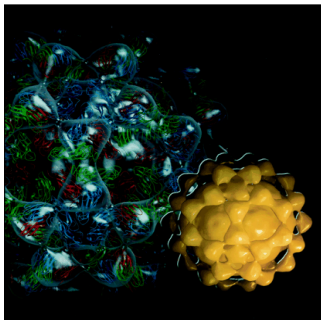


ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Η Ασθένεια της Ιογενούς Νευρικής Νέκρωσης η Εγκεφαλοπάθειας (VNN) σε καλλιεργούμενα ψάρια. Επιδημιολογία, διάγνωση και θεραπεία της νόσου

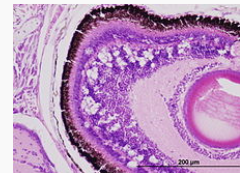


ΒΑΣΙΛΗΣ ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣ

Εισηγητής: Δρ. Πούλος Κωνσταντίνος

ΜΕΣΟΛΟΓΓΙ 2015

Betanodavirus



Vacuoles in retina of
Australian bass larva
affected with NNV

Virus classification

Group: Group
IV ((+)ssRNA)

Family: ***Nodaviridae***

Genus: Betanodavirus

Ευχαριστίες

Θα θελα να ευχαριστήσω θερμά τον καθηγητή μου Δρ. Πούλο Κωνσταντίνο κυρίως για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, και την υπομονή που έκανε κατά τη διάρκεια υλοποίησης της πτυχιακής εργασίας. Όπως επίσης και για την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγηση του, για την επίλυση διάφορων θεμάτων. Θα θελα επίσης να απευθύνω τις ευχαριστίες μου στους γονείς μου, οι οποίοι στήριξαν τις σπουδές μου με διάφορους τρόπους, φροντίζοντας για την καλύτερη δυνατή μόρφωση μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	4
Λίστα Πινάκων.....	5
Λίστα Εικόνων.....	6
1. Εισαγωγή.....	7
1.1. Τρέχουσα και μελλοντική κατάσταση της υδατοκαλλιέργειας.....	7
1.2. Μεσογειακή θαλάσσια υδατοκαλλιέργεια.....	8
1.3. Ασθένειες στη Μεσογειακή θαλάσσια ιχθυοκαλλιέργεια.....	10
2. Ιογενής Νευρική Νέκρωση (VNN).....	12
2.1. Εισαγωγή.....	12
2.2. Γεωγραφική Κατανομή και Ευπαθή Είδη του VNN.....	13
2.3. Παρουσία του ιού VNN στην Μεσόγειο.....	16
2.4. Κλινικά συμπτώματα και χαρακτηριστικά.....	17
2.5. Παθογόνος ιός.....	19
3. Διάγνωση.....	20
4. Τρόποι πρόληψης και αντιμετώπισης της ασθένειας.....	21
4.1. Πρόληψη.....	21
4.1.1. Εμβολιασμός.....	23
4.2. Αντιμετώπιση.....	23
5. Ερευνητική δραστηριότητα.....	24
6. Βιβλιογραφία.....	25

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ιογενής νευρική νέκρωση (VNN) ή ιογενής εγκεφαλοπάθεια η αμφιβληστροειδοπάθεια (VER) που προκαλείται από τον ιό betanodavirus (Nodaviridae) έβλαψε σοβαρά την παγκόσμια θαλάσσια υδατοκαλλιέργεια από την πρώτη εμφάνισή του στα τέλη της δεκαετίας του 1980. Η νόσος περιγράφεται σε περισσότερα από 50 είδη ψαριών σε όλο τον κόσμο, θεωρείται ως η πιο σοβαρή ιογενής απειλή που αντιμετωπίζουν τα θαλάσσια εκτρεφόμενα είδη στην περιοχή της Μεσογείου, πράγμα που αντιπροσωπεύει ένα από τα εμπόδια για την περαιτέρω ανάπτυξη του κλάδου της υδατοκαλλιέργειας. Αυτή ή μόλυνση προκαλεί συχνά ποσοστά θνησιμότητας υψηλότερα από το 99% και οδηγεί σε συνολικές απώλειες στα εκκολαπτήρια. Κατά τις δύο τελευταίες δεκαετίες, έχουν δημοσιευθεί περισσότερα από 100 έγγραφα σχετικά με τη νόσο. Αν και οι πληροφορίες είναι ακόμη περιορισμένες, τώρα έχουμε περισσότερες γνώσεις σχετικά με την ταξινομική του θέση, τα μοριακά χαρακτηριστικά των betanodaviruses, τους μηχανισμούς διάγνωσης, τον έλεγχο και την δράση της νόσου. Σε αυτή την εργασία παρουσιάζονται συνοπτικά και μελέτες που αναφέρουν τις οικονομικές συνέπειες που έχει ο ιός VNN στην Μεσογειακή ιχθυοκαλλιέργεια.

Λέξεις κλειδιά: VNN, υδατοκαλλιέργεια, betanodaviruses, Μεσογειακή.

Λίστα Πινάκων

Πίνακας 2.2.1 Περιστατικά της κλινικής ιογενούς νευρικής νέκρωσης (VNN) - είδη ψαριών και χώρες / περιοχές.....	14-15
--	-------

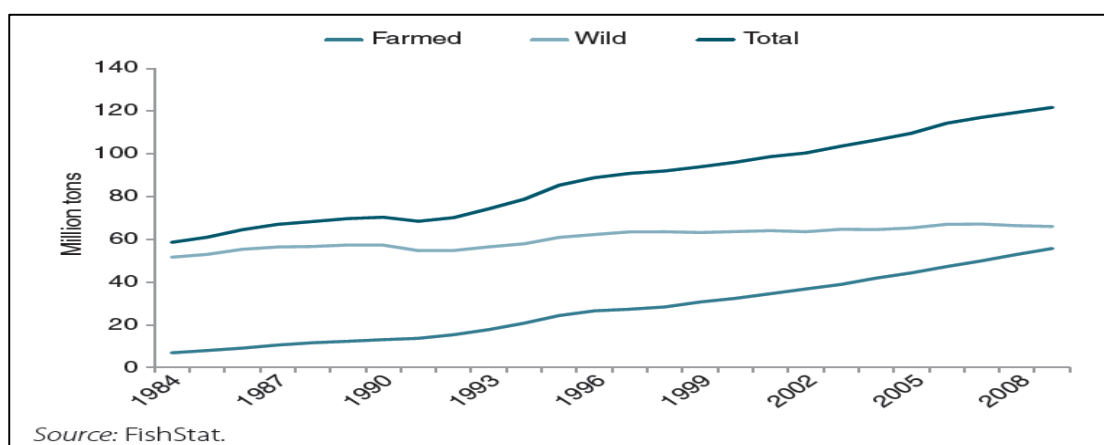
Λίστα Εικόνων

- Εικόνα 1.1.** Εξέλιξη της παγκόσμιας παραγωγής ψαριών από 1984-2009.....7
- Εικόνα 1.2.** Μέσο ετήσιο ποσοστό αύξησης της αλίευσης και παραγωγής ψαριών από το 1960-2009.....8
- Εικόνα 1.2.1** Συνολική παραγωγή της υδατοκαλλιέργειας στην Ελλάδα 1950-2010 (FAO).....9
- Εικόνα 1.3.1** Η Ασθένεια σπανίως προκύπτει από μία απλή επαφή μεταξύ του ξενιστή και του οργανισμού που προκαλεί την ασθένεια.....11
- Εικόνα 2.4.1** Τυπικές ιστολογικές βλάβες της ιογενούς νευρικής νέκρωσης. Εγκέφαλος λαβρακιού που δείχνει σοβαρή νευρωνική κενотоπιώδης κατάσταση (βέλη) (Noga, 2011).....17
- Εικόνα 2.4.2** Ιστολογική τομή του εγκεφάλου του λαβρακιού (*D. labrax*) που επηρεάζεται από podavirus και παρουσιάζει κενотоπιώδη κατάσταση σε μέρος του τελεγκεφάλου και εστιακή γλοιωμάτωση (Rodger, 2010).....18
- Εικόνα 2.4.3** Τυπικές ιστολογικές βλάβες της ιογενούς νευρικής νέκρωσης. Αμφιβληστροειδής χιτώνας σε μπακαλιάρο του Ατλαντικού που δείχνει την κενотоπιώδης κατάσταση (βέλη) σε όλα τα στρώματα των κυττάρων (Noga, 2011).19

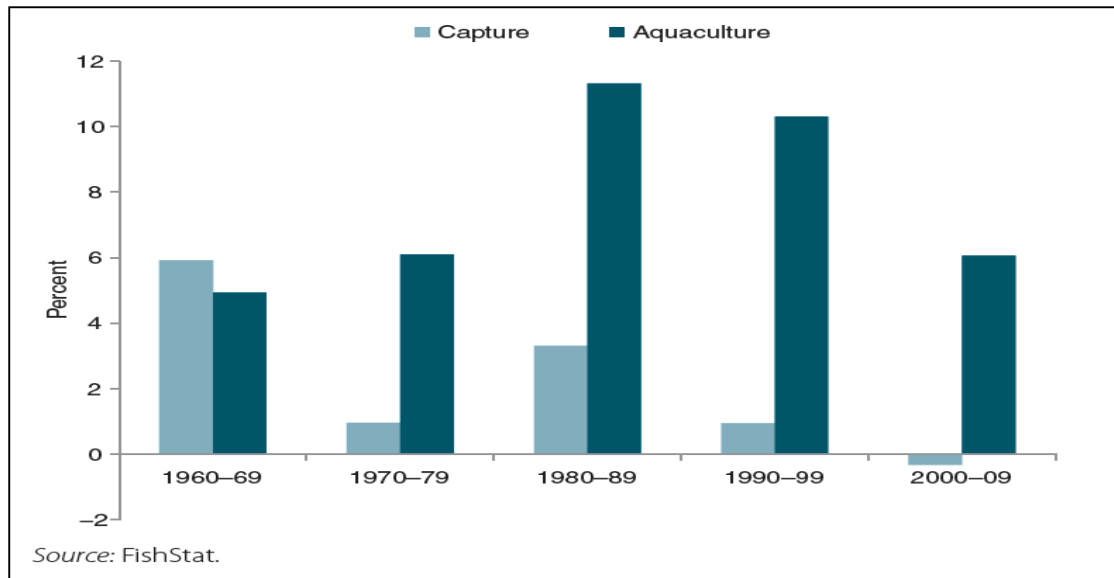
1. Εισαγωγή

1.1 Τρέχουσα και μελλοντική κατάσταση της υδατοκαλλιέργειας

Ενώ τα επίπεδα της παγκόσμιας παραγωγής εκτρεφόμενων ιχθύων είναι ακόμα μικρά σε σύγκριση με την παγκόσμια παραγωγή πουλερικών και χοίρων (Brugère and Ridler, 2004; FAO, 2012), ο κλάδος της υδατοκαλλιέργειας είναι ο πιο ραγδαία αναπτυσσόμενος τομέας της ζωικής παραγωγής σε παγκόσμιο επίπεδο, διευρύνοντας τον μέσο ετήσιο ρυθμό άνω του 8 τοις εκατό, (από 5,2 εκατομμύρια τόνους το 1981 έως 62.700.000 τόνους το 2011), κατά τη διάρκεια των τελευταίων τριών δεκαετιών (FAO, 2012). Επιπλέον, καθώς η παγκόσμια ζήτηση για τα υδρόβια προϊόντα αυξάνεται, πιστεύεται ότι η παραγωγή εκτρεφόμενων υδρόβιων ειδών θα συνεχίσει να αυξάνεται τις επόμενες δεκαετίες (Delgado, *et al.*, 2003; Brugère and Ridler, 2004; Failler, 2006; FAO, 2012). Συγκεκριμένα από το 2020 η παγκόσμια υδατοκαλλιέργεια συμφώνησε να επιτύχει ένα ορόσημο ανάπτυξης της τάξης του 1,9%. Η υψηλότερη πρόβλεψη εξόδου στοχεύει σε μια αύξηση της παραγωγής κατά 3,3% (Brugère and Ridler, 2004), έτσι ώστε περισσότερο από το ήμισυ της παγκόσμιας ζήτησης για τα υδρόβια προϊόντα να προμηθευτείται από τις υδατοκαλλιέργειες.



Εικόνα 1.1. Εξέλιξη της παγκόσμιας παραγωγής ψαριών από 1984-2009



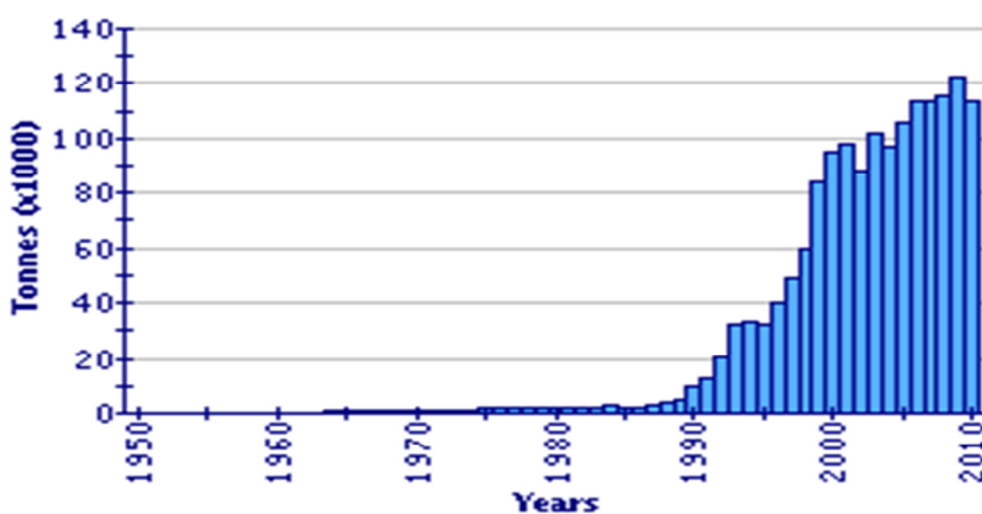
Εικόνα 1.2. Μέσο ετήσιο ποσοστό αύξησης της αλίευσης και παραγωγής ψαριών από το 1960-2009.

1.2 Μεσογειακή θαλάσσια υδατοκαλλιέργεια

Η Σύγχρονη θαλασσοκαλλιέργεια στην Μεσόγειο ξεκίνησε τη δεκαετία του 1980, κυρίως με την καλλιέργεια του λαβρακιού (*Dicentrarchus labrax*), τσιπούρας (*Sparus aurata*) και οστρακοειδών (Grigorakis and Rigos, 2011). Κατά τη διάρκεια της δεκαετίας του 1990, εισήχθη η εκτροφή και η καλλιέργεια του τόνου του Ατλαντικού (*Thunnus thynnus*) και άλλων ψαριών της οικογένειας Sparidae (Grigorakis and Rigos, 2011). Τις τρεις τελευταίες δεκαετίες ακολουθώντας την παγκόσμια τάση, η μεσογειακή θαλασσοκαλλιέργεια γνώρισε μια ραγδαία ανάπτυξη. Συγκεκριμένα, ενώ η συνολική παραγωγή αντιστοιχούσε σε 90 000 τόνους το 1985, το 2007 έχουν αυξηθεί σε 436 401 τόνους για τα θαλασσινά ψάρια και 174 385 τόνους για τα μαλάκια (CAQ-GFCM, 2008, 2009; FAO, 2008; Barazi-Yeroulanos, 2010).

Πολλά θαλάσσια είδη ψαριών έχουν καλλιεργηθεί στη Μεσόγειο, σημαντικότερα από εμπορικής σημασίας εξακολουθούν να είναι η τσιπούρα και το λαβράκι (Grigorakis and Rigos, 2011). Η εκτροφή του ατλαντικού τόνου έχει φθάσει σήμερα σε μια σημαντική παραγωγή και σύμφωνα με τον FAO (FAO, 2006), η παγκόσμια

παραγωγή τόνου αυξήθηκε σχεδόν 15 φορές κατά την τελευταία δεκαετία με την Μεσογειακή καλλιέργεια να φτάνει στα ίδια ποσά. Όσον αφορά τα οστρακοειδή, η παραγωγή αντιπροσωπεύεται κυρίως από το Ευρωπαϊκό μύδι (*Mytilus galloprovincialis*), το Ιαπωνικό μύδι (*Ruditapes philippinarum*), το Ευρωπαϊκό στρείδι (*Ostrea edulis*) και το στρείδι του Ειρηνικού (*Crassostrea gigas*) (CAQ-GFCM, 2008). Η καλλιέργεια των υδρόβιων φυτών και των καρκινοειδών παραμένει ακόμη σε χαμηλά επίπεδα (Grigorakis and Rigos, 2011).



Εικόνα 1.2.1 Συνολική παραγωγή της υδατοκαλλιέργειας στην Ελλάδα 1950-2010 (FAO)

Για την αντιμετώπιση της συνεχής αύξησης της παραγωγής, η Μεσογειακή θαλάσσια υδατοκαλλιέργεια έχει μετακινηθεί από τις μικρές χερσαίες επιχειρήσεις σε μεγάλες επιχειρήσεις που βρίσκονται κατά μήκος της ακτογραμμής και, πιο πρόσφατα, σε εκτός ακτής "off-shore" τοποθεσίες. Ένα μέρος της εντατικής παραγωγής οστρακοειδών έχει επίσης μετατοπιστεί από τις παράκτιες περιοχές της λιμνοθάλασσας σε υπεράκτιες περιοχές. Η συνειδητοποίηση της μοναδικότητας της Μεσογείου είναι υποχρεωτική για να διατηρηθεί η αυξημένη παραγωγικότητα της θαλασσοκαλλιέργειας. Αυτή η ημίκλειστη λεκάνη χαρακτηρίζεται από πολλές ιδιαιτερότητες, όπως το χαμηλό τροφικό δυναμικό, τις υψηλές θερμοκρασίες της

θάλασσας, την παρουσία φωσφόρου που περιορίζει την πρωτογενή παραγωγή, τη χαμηλή ταχύτητα καθίζησης και υψηλή θαλάσσια κυκλοφορία (CIESM, 2007).

1.3 Ασθένειες στη Μεσογειακή θαλάσσια ιχθυοκαλλιέργεια

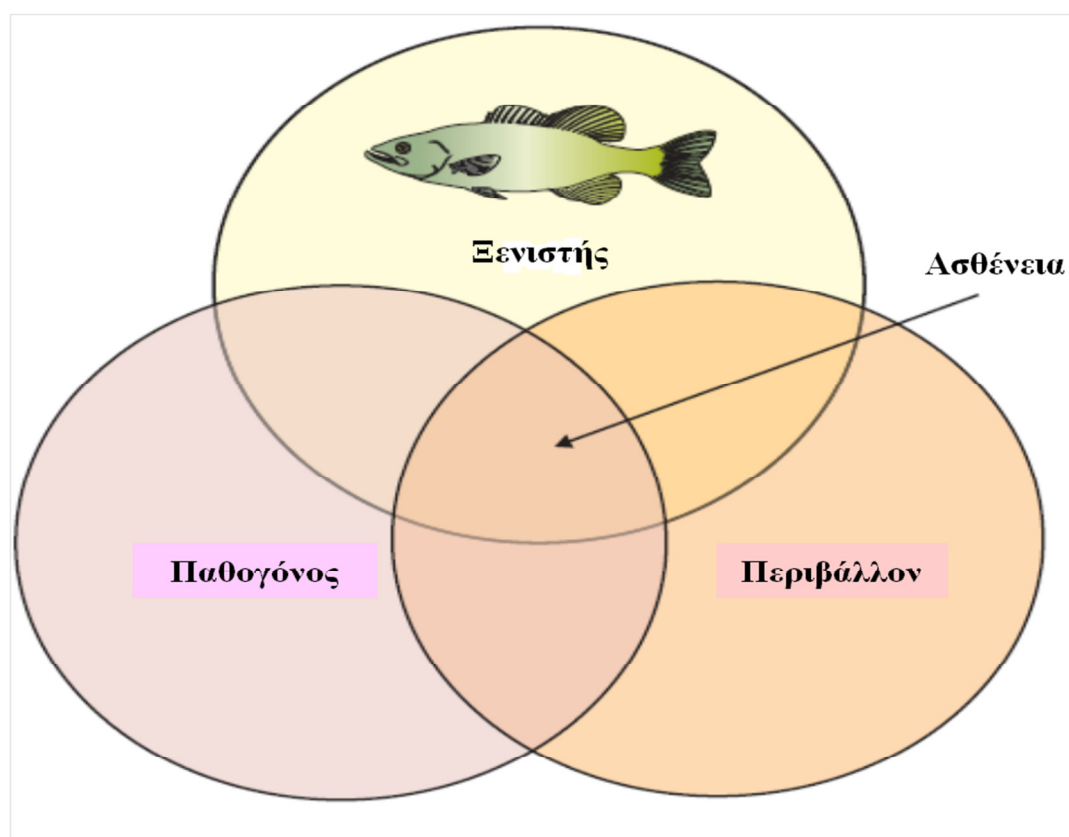
Εντατικά συστήματα καλλιέργειας με το σχετικό στρες και άλλους κινδύνους εκτροφής αυξάνουν σημαντικά την απειλή μολύνσεων (Magnadottir, 2010). Επιπλέον, η υψηλή πυκνότητα των ψαριών στην υδατοκαλλιέργεια αυξάνει την εξάπλωση της ασθένειων. Μολυσματικές ασθένειες ψαριών μπορεί να προκαλούνται από παθογόνους μικροοργανισμούς και σε ορισμένες περιπτώσεις απο καιροσκοπικά βακτήρια, ιούς, παράσιτα ή μύκητες (Magnadottir, 2010).

Τα κύρια προβλήματα υγείας στη Μεσογειακή θαλάσσια ιχθυοκαλλιέργεια εξακολουθούν να συνδέονται με μολυσματικούς παράγοντες, όπως τους ιούς (lymphocystis, nodavirus, λοιμώδη παγκρεατική νέκρωση (IPN), λοιμώδη αιματοποιητική νέκρωση (IHN), ιογενή αιμορραγική σηψαιμία (VHS), εαρινή ιαιμία του κυπρίνου (SVC), γατόψαρο-iridovirus, γατόψαρο-herpervirus και χέλι-herpervirus), βακτήρια (*Vibrio* spp., *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida* και *damsela*, *Pseudomonas anguilliseptica*, *Tenacibaculum maritimum*, *Streptococcus* spp., *Mycobacterium* spp., *Epitheliocystis*), μύκητες (*Ichthyophonus*, *Ochroconis*), εξωπαράσιτα (*Amyloodinium ocellatum*, *Trichodina* spp., *Brooklynella hostilis*, *Cryptocaryon irritans*, *Scuticociliates*), μικροσπόρια και καρκινοειδή παράσιτα (Barja, 2004; Magnadottir, 2010; Pavlidis and Mylonas, 2011).

Αν και οι απώλειες που οφείλονται σε παθογόνους μικροοργανισμούς, είναι ένας από τους κύριους παράγοντες που επηρεάζουν τη βιωσιμότητα του κάθε κλάδου της ιχθυοκαλλιέργειας, και παρά το γεγονός ότι πολύ συχνά έχουμε υπόνοιες ότι τα άγρια ψάρια είναι φορείς πολλών παθογόνων, η διασταυρωμένη μόλυνση μεταξύ

καλλιεργούμενων και άγριων ειδών είναι ένα θέμα που δεν έχει ερευνηθεί σε βάθος στην Μεσόγειο (Raynard *et al.*, 2007).

Ένας άλλος παραγοντας που συμβαλλει στην αναπτυξη ασθενειών είναι ότι το ανοσοποιητικό σύστημα των υδρόβιων οργανισμών μπορεί να επηρεαστεί σημαντικά από διάφορους εξωτερικούς παράγοντες, όπως η θερμοκρασία, το φως, την ποιότητα του νερού, την αλατότητα και το στρες (Magnadottir, 2010). Τα ψάρια ως εξώθερμα ή ποικιλόθερμα ζώα επηρεάζονται από τις περιβαλλοντικές αλλαγές και αυτό το γεγονός μπορεί να έχει σημαντικές επιπτώσεις στο ανοσοποιητικό τους σύστημα (Magnadottir, 2010). Ένα άλλο γενικά αποδεκτό παράδειγμα είναι ότι το άγχος, ειδικά χρόνιο άγχος, μπορεί να καταστρέφει το ανοσοποιητικό σύστημα του ψαριού και να μειώσει την αντίσταση του στις ασθένειες (Magnadottir, 2010).



Εικόνα 1.3.1 Η Ασθένεια σπανίως προκύπτει από μία απλή επαφή μεταξύ του ξενιστή και του οργανισμού που προκαλεί την ασθένεια.

2. Ιογενής Νευρική Νέκρωση (VNN)

2.1 Εισαγωγή

Το κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ), έχει θεωρηθεί ως ένα ανοσο-προνομιούχο όργανο λόγω της ύπαρξης ενός φυσικού φραγμού μεταξύ του αίματος και του εγκεφάλου, δηλαδή το φράγμα αίματος-εγκεφάλου (ΦΑΕ) (Bechmann *et al.*, 2007). Ωστόσο, η επέκταση του νοήματος του ιού στο πλαίσιο της αναστολής της πρόσληψης λευκοκυττάρων στον εγκέφαλο είναι ασαφής και ορισμένοι συγγραφείς έχουν επαναπροσδιορίσει το ΦΑΕ ως τριχοειδή φραγμό για διαλυμένες ουσίες, ενώ τα λευκοκύτταρα είναι σε θέση να διασχίσουν το ΦΑΕ μέσω πολλαπλής διαδοχικής διαδικασίας (Bechmann *et al.*, 2007; Greenwood *et al.*, 2011). Από την άλλη πλευρά, μετά από μόλυνση του ΚΝΣ αυτά τα προστατευτικά φράγματα είναι δυνατόν να παραβιαστούν, κι αυτό μπορεί να οδηγήσει σε σοβαρές νευρολογικές επιπλοκές που προκαλούνται από μια ανισορροπία ή μπλοκάρισμα της νευρικής χημείας, η οποία μπορεί να αποβεί μοιραία (Kang and McGavern, 2010).

Η επίσημη ονομασία της νόσου που προκαλείται από λοιμώξεις με podavirus στα ψάρια είναι ιογενής εγκεφαλοπάθεια η αμφιβληστροειδοπάθεια (VER), όπως συνιστάται από το Διεθνές Γραφείο Επιζωοτιών (OIE 2003), αλλά και το όνομα ιογενής νευρική νέκρωση (VNN) εξακολουθεί να χρησιμοποιείται από πολλούς (Hodneland *et al.*, 2011). VER είναι μια άκρως μολυσματική νευροπαθολογική ασθένεια που επηρεάζει ένα ευρύ φάσμα ψαριών, και συχνά οδηγεί σε μοιραία αποτελέσματα ιδιαίτερα σε προνυμφες και σε νεανικά στάδια (Munday *et al.*, 2002). Αρκετές εργασίες αναφέρουν επεισόδια μαζικής θνησιμότητας που προκαλούνται από κρούσματα του VER, με σημαντικές οικονομικές επιπτώσεις στη θαλάσσια υδατοκαλλιέργεια (Glazebrook *et al.*, 1990; Munday *et al.*, 1992; Grotmol *et al.*, 1995; Le Breton *et al.*, 1997; Ransangan and Manin, 2010).

2.2 Γεωγραφική Κατανομή και Ευπαθή Είδη του VNN

VNN έχει αναφερθεί σε όλες τις ηπείρους εκτός από τη Νότια Αμερική (Johnson *et al.*, 2002; Munday *et al.*, 2002; Azad *et al.*, 2005). Αυτές περιλαμβάνουν τη Νότια και Ανατολική Ασία (Ιαπωνία, την Κορέα, την Ταϊβάν, την Κίνα, τις Φιλιππίνες, την Ταϊλάνδη, το Βιετνάμ, τη Μαλαισία, τη Σιγκαπούρη, την Ινδονησία, το Μπρουνέι, Ινδία), Ωκεανία (Αυστραλία, Ταϊτή), τη Μεσόγειο (Ισραήλ, την Κροατία, τη Βοσνία, την Ελλάδα, Μάλτα, Ιταλία, Γαλλία, Ισπανία, Πορτογαλία, Τυνησία), το Ηνωμένο Βασίλειο, τη Σκανδιναβία (Νορβηγία), και τη Βόρεια Αμερική (ΗΠΑ, Καναδάς). Η ανεμπόδιστη κίνηση των αποθεμάτων ιχθύων στις διάφορες γεωγραφικές περιοχές υπήρξε ένας σημαντικός λόγος για την εξάπλωση των μολύνσεων από το nodavirus στο θαλάσσιο περιβάλλον (Munday *et al.*, 2002).

Η ασθένεια έχει παρουσιασθεί σε ένα ευρύ φάσμα θαλάσσιων ιχθύων και συχνά οδηγεί σε ταχεία θνησιμότητα γενικά κατά τη διάρκεια του γόνου και των νεαρών σταδίων του ψαριού (Munday *et al.*, 2002). Επίσης σημαντική νοσηρότητα και θνησιμότητα έχει συσχετιστεί με λοιμώξεις του nodavirus στα ψάρια που βρίσκονται σε μέγεθος αγοράς (Aspehaug *et al.*, 1999; Nylund *et al.*, 2008).

Ο αριθμός των ειδών των ψαριών που επηρεάζονται από το VNN αυξάνεται σταθερά. Σε μια πρώιμη σύντομη ανασκόπηση της ασθένειας, 19 είδη ψαριών (10 οικογένειες, 3 τάξεις), περιγράφονταν ως ξενιστες του VNN (Munday and Nakai, 1997). Σε μία επόμενη πλήρη ανασκόπηση άρθρων, 32 είδη (16 οικογένειες, 5 τάξεις) αναφέρονται (Πίνακας 2.2.1) (Munday *et al.*, 2002) σε πιο πρόσφατες δημοσιεύσεις και μη δημοσιευμένα δεδομένα, 39 είδη ξενιστών περιλαμβάνονται (22 οικογένειες, 8 τάξεις) (Nakai *et al.*, 2009).

Πίνακας 2.2.1 Περιστατικά της κλινικής ιογενούς νευρικής νέκρωσης (VNN) - τα είδη ψαριών και τις χώρες / περιοχές

Είδη ψαριών	Χώρες/περιοχές
Τάξη Εγγελομόρφα	
Οικογένεια Anguillidae	
Ευρωπαϊκό γέλι	Ταϊβάν
Τάξη Γαδόμορφα	
Οικογένεια Gadidae	
Μπακαλιάρος του Ατλαντικού	Ηνωμένο Βασίλειο, Καναδάς
Τάξη Περκόμορφα	
Οικογένεια Centropomidae	
Barramundi	Αυστραλία, Κίνα, Ινδονησία, Ισραήλ, Μαλαισία, Φιλιππίνες, Σιγκαπούρη, Ταϊτή, Ταϊβάν, Ταϊλάν
Ιαπωνικό λαβράκι	Ιαπωνία
Οικογένεια Percithydae	
Λαβράκι	Καραϊβική, Γαλλία, Ελλάδα, Ιταλία, Μάλτα, Πορτογαλία, Ισπανία
Οικογένεια Serranidae	
Ροφός με κόκκινα στίγματα	Ιαπωνία, Ταϊβάν
Κίτρινος ροφός	Ταϊβάν
Ροφός με μαύρα στίγματα	Ταϊβάν
Ροφός με καφέ στίγματα	Ταϊλάνδη, Κίνα
Ροφός με πρτοκαλί στίγματα	Κίνα
Λιπαρός ροφός	Κίνα
Ροφός με λωρίδες	Κίνα
Ροφός	Μεσόγειος
Kelp-ροφός	Ιαπωνία
Sevenband-ροφός	Ιαπωνία, Κορέα
Αραβικός ροφός	Μαλαισία, Φιλιππίνες, Σιγκαπούρη
Καμπούρης ροφός	Ινδονησία
Οικογένεια Latridae	
Striped trumpeter	Αυστραλία

Πίνακας 2.2.1 (Συνέχεια)

Είδη ψαριών	Χώρες/περιοχές
Οικογένεια Carangidae	
Striped jack	Ιαπωνία
Μαγιάτικο	Ιαπωνία
Snubnose pomprano	Ταϊβάν
Οικογένεια Sparidae	
Τσιπούρα	Ιταλία
Οικογένεια Sciaenidae	
Κοκκινόψαρο	Κορέα
Μυλοκόπι	Γαλλία, Ιταλία
Λευκό λαβράκι	Ηνωμένες Πολιτείες
Οικογένεια Oplegnathidae	
Japanese parrotfish	Ιαπωνία
Τσιπούρα βράχου	Ιαπωνία
Οικογένεια Eleotridae	
Sleepy-μπακαλιάρος	Αυστραλία
Οικογένεια Rachycentridae	
Μαύρος σολομός	
Τάξη Πλευρόφορμα	
Οικογένεια Pleuronectidae	
Barfin flounder	Ιαπωνία
Χάλιμπατ του Ατλαντικού	Νορβηγία, Ηνωμένο Βασίλειο
Οικογένεια Bothidae	
Ιαπωνικό καλκάνι	Ιαπωνία
Καλκάνι	Νορβηγία
Οικογένεια Soleidae	
Dover sole	Ηνωμένο Βασίλειο
Τάξη Τετραδοντόμορφα	
Οικογένεια Triodontidae	
Γουρουνόψαρο	Ιαπωνία

* δεδομένα κυρίως από Munday *et al.*, 2002.

2.3 Παρουσία του ιού VNN στην Μεσόγειο

Δεκαοκτώ εργαστήρια από 9 διαφορετικές χώρες (Κροατία, Κύπρος, Ισπανία, Γαλλία, Ελλάδα, Ισραήλ, Ιταλία, τη Μάλτα και την Τουρκία) ασχολούνται με τον ιό σε περιπτώσεις παρακολούθησης ρουτίνας και θνησιμότητας (Barja, 2004). Μερικά εργαστήρια καταγράφουν σοβαρές απωλεις σε ιχθυογεννητικούς σταθμούς, σε προνυμφες και στα νεανικά στάδια του λαβρακιού (Barja, 2004).

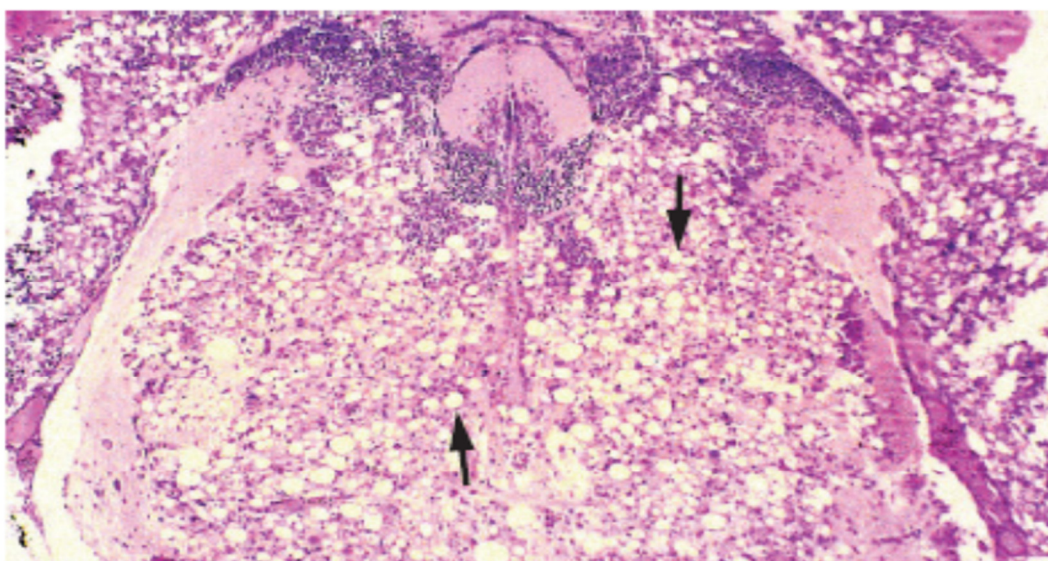
Το λαβράκι, *Dicentrarchus labrax* (L.), θεωρείται το κυριότερο είδος-στόχος στη μεσογειακή ιχθυοκαλλιέργεια. Οι απώλειες στο πεδίο μπορεί να κυμαίνονται από 11%-60% σε κλωβούς στη θάλασσα και 11% έως 50% στις δεξαμενές (Le Breton *et al.*, 1997; Cherif *et al.*, 2009). Διαφορετικές υποθέσεις έχουν προταθεί για την εξήγηση του διαφορετικού ρυθμού θνησιμότητας, όπως το μέγεθος / ηλικία των πληγέντων ψαριών και τις περιβαλλοντικές συνθήκες (π.χ. θερμοκρασία νερού). Είναι ήδη γνωστό ότι οι διαφορετικοί γονότυποι του VER / VNN, έχουν διαφορετικές βέλτιστες "in vitro" θερμοκρασίες ανάπτυξης (Iwamoto *et al.*, 2000; Hata *et al.*, 2010). Το στέλεχος της παθογένειας έχει διαχωριστεί κάτω από πειραματικές συνθήκες σε δύο διαφορετικά στελέχη του ιού όπου αποκαλύφθηκε διαφορετική παθογένεια στις νύμφες του ευρωπαϊκού λαβρακιού (Breuil *et al.*, 2001).

Στο Ισραήλ, η σφυρίδα, *Epinephelus aeneus* (Geoffroy & Hilaire), βρίσκεται υπό μελέτη ως υποψήφιο είδος για θαλασσοκαλλιέργεια από τις αρχές της δεκαετίας του 1990 (Ucko *et al.*, 2004). Το αρχικό απόθεμα γεννητόρων αποτελούν άγρια ψάρια από τη μεσογειακή ακτή του Ισραήλ (Ucko *et al.*, 2004). Τα τελευταία χρόνια, ένας σημαντικός αριθμός των ψαριών, γεννητόρων και προνυμφών, υπέστησαν υψηλά ποσοστά θνησιμότητας (Ucko *et al.*, 2004). Τα ψάρια παρουσίασαν κλινικά

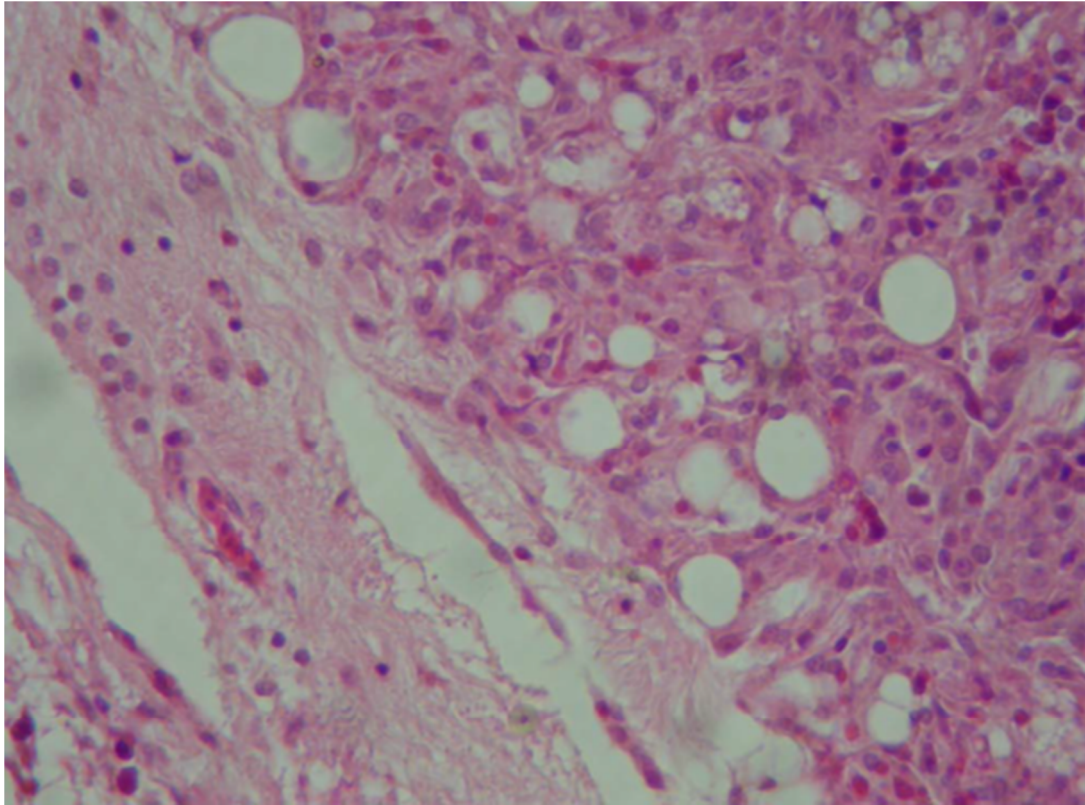
συμπτώματα συμβατά με λοιμώξεις του podavirus, δηλαδή ανωμαλίες στη συμπεριφορά και τον χρωματισμό (Munday *et al.*, 2002).

2.4 Κλινικά συμπτώματα και χαρακτηριστικά

Η νόσος εμφανίζεται κυρίως στα πρώιμα στάδια ανάπτυξης των ψαριών (νυμφών και ιχθυδίων). Δεν υπάρχουν σοβαρά κλινικά σημάδια στην επιφάνεια του σώματος ή τα βράγχια σε οποιοδήποτε στάδιο του ιού (Nakai *et al.*, 2009). Επηρεαζόμενα ιχθύδια και μεγαλύτερα ψάρια δείχνουν μια ποικιλία από ασταθείς συμπεριφορές όπως σπειροειδές κολύμπι, στροβιλίσμος, η κοιλιακή χώρα του ψαριού να επιπλέει στην επιφάνεια του νερού, και την βλάβη της νηχτικής κύστης, αλλά δεν είναι ασυνήθιστο να παρουσιαστούν τέτοιες ανωμαλίες στο κολύμπι και στις επηρεαζόμενες προνύμφες (Nakai *et al.*, 2009). Ιστοπαθολογικά, η ασθένεια χαρακτηρίζεται από σοβαρά εκτεταμένη νέκρωση και σχηματισμό κενотоπιών στο κεντρικό νευρικό σύστημα (εγκέφαλος, νωτιαίος μυελός) και στον αμφιβληστροειδή χιτώνα, αλλά μερικές φορές ψάρια σε πρώιμα προνυμφικά στάδια στερούνται κενотоπίου ιστού (Munday *et al.*, 2002).

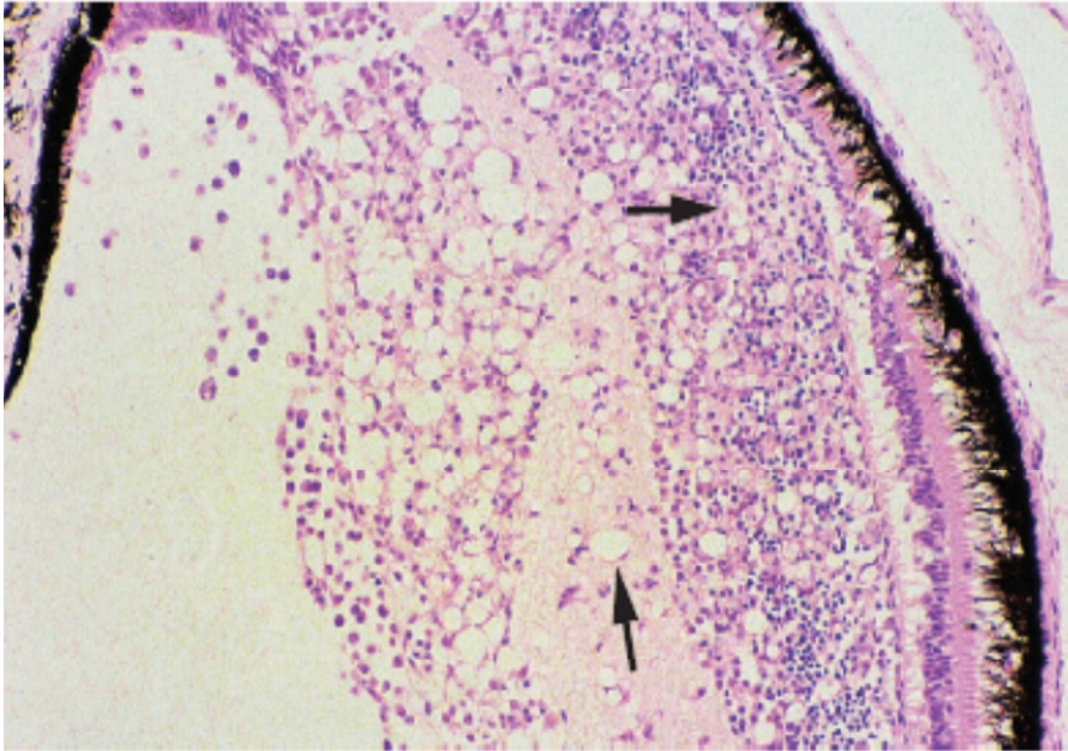


Εικόνα 2.4.1 Τυπικές ιστολογικές βλάβες της ιογενούς νευρικής νέκρωσης. Εγκέφαλος λαβρακιού που δείχνει σοβαρή νευρωνική κενотоπιώδη κατάσταση (βέλη) (Noga, 2011).



Εικόνα 2.4.2 Ιστολογική τομή του εγκεφάλου του λαβρακιού (*D. labrax*) που επηρεάστηκε από nodavirus και παρουσιάζει κενοδοπιώδη κατάσταση σε μέρος του τελεγκεφάλου και εστιακή γλοιωμάτωση (Rodger, 2010).

Υπάρχει σημαντική διαφορά από την ηλικία κατά την οποία η ασθένεια παρατηρείται για πρώτη φορά και την περίοδο κατά την οποία συμβαίνει η θνησιμότητα (Munday *et al.*, 2002; OIE 2003). Σε γενικές γραμμές, όσο πιο γρήγορα παρουσιαστούν τα προγενέστερα σημάδια της νόσου, τόσο μεγαλύτερος είναι ο ρυθμός της θνησιμότητας (Nakai *et al.*, 2009). Στο λαβράκι, η θνησιμότητα συνήθως δεν παρατηρείται έως ότου περασουν περίπου 30 ημέρες από την εκκόλαψη. Η εμφάνιση νέων εστιών της νόσου συμβαίνει ακόμη και στην αγορά (Le Breton *et al.*, 1997). Η θνησιμότητα των νεαρών ή μεγαλύτερων ψαριών συνήθως δεν φθάνει το 100%, υποδεικνύοντας έτσι την εξάρτηση της ευαισθησίας με την ηλικία.



Εικόνα 2.4.3 Τυπικές ιστολογικές βλάβες της ιογενούς νευρικής νέκρωσης στον αμφιβληστροειδή χιτώνα σε μπακαλιάρo του Ατλαντικού που δείχνει την κενотоπιώδη κατάσταση (βέλη) σε όλα τα στρώματα των κυττάρων (Noga, 2011).

2.5 Παθογόνος ιός

Όλα τα podaviruses που επηρεάζουν τα ψάρια ανήκουν στο γένος *Betanodavirus* το οποίο, μαζί με το γένος *Alphanodavirus* του οποίου τα μέλη μολύνουν μόνο έντομα, αποτελούν την οικογένεια *Nodaviridae* (Hodneland *et al.*, 2011). Τα σωματίδια του *Betanodavirus* είναι μικρά (20-30 nm), με ένα διαμορφωμένο εικοσαεδρικό καψίδιο και ενός γυμνού μονόκλωνου RNA (θετική έννοια), γονιδίωμα που αποτελείται από τα δύο τμήματα RNA1 και RNA2 (Hodneland *et al.*, 2011). Το τμήμα RNA1 (3.1 Kb) κωδικοποιεί το RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση (RdRp) ή την πρωτεΐνη A, ενώ το τμήμα RNA2 (1.4 Kb) κωδικοποιεί το πρωτεϊνικό περίβλημα (Mori *et al.*, 1992). Το RNA3 υπογονιδιωματικό μετάγραφο (0.4 Kb) συντίθεται από το άκρο 3' του μορίου RNA1 κατά την αντιγραφή του RNA κωδικοποιεί την

πρωτεΐνη B1 και B2, η οποία δρα ως αντι-νεκρωτική λειτουργία κυτταρικού θανάτου και ανταγωνίζεται τους μηχανισμούς παρεμβολής RNA του κυττάρου-ξενιστή, αντιστοίχως (Fenner *et al.*, 2006; Chen, Su & Hong 2009). Σύμφωνα με τη φυλογενετική ανάλυση της μεταβλητής περιοχής T4 εντός του τμήματος RNA2, betanodavirus μπορούν να ταξινομηθούν σε τέσσερις διαφορετικούς γονότυπους: "striped jack" ιός νευρικής νέκρωσης (SJNNV), "tiger puffer" ιός νευρικής νέκρωσης (TPNNV), "barfin flounder" ιός νευρικής νέκρωσης και "red-spotted grouper" ιός νευρικής νέκρωσης (RGNNV) (Nishizawa *et al.*, 1997).

3. Διάγνωση

Όταν παρουσιαστεί υψηλός δείκτης θνησιμότητας στις ευαίσθητες προνύμφες στα εκκολαπτήρια, χωρίς την παρουσία παθογόνων παραγόντων στην κλινική κατεργασία, τότε η λοίμωξη podavirus θα πρέπει να αποκλειστεί (Noga, 2011). Για ιολογικές εξετάσεις, θα πρέπει να λαμβάνονται δείγματα από ολόκληρες προνύμφες ή ιχθύδια (Noga, 2011). Από μεγαλύτερα ψάρια, πρέπει να λαμβάνονται δείγματα του εγκεφάλου, του νωτιαίου μυελού και των ματιών (Noga, 2011). Υποθετική διάγνωση μπορεί να γίνει με ιστοπαθολογία του εγκεφάλου ή / και του αμφιβληστροειδή χιτώνα που δείχνει την τυπική κενοτοπιοποιητική εγκεφαλοπάθεια, νέκρωση, και αμφιβληστροειδοπάθεια (Noga, 2011). Εντούτοις, μερικά ψάρια μπορεί μερικές φορές να έχουν μόνο λίγα κενοτόπια στον εγκεφαλο τους, καθιστώντας τη διάγνωση πολύ δύσκολη (Noga, 2011). Τα σωματίδια του ιού μπορούν να ανιχνευθούν στον ιστό του εγκεφάλου μέσω της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας, αλλά αυτό είναι μόνο μια συμπερασματική διάγνωση (Noga, 2011). Η οριστική διάγνωση μπορεί να επιτευχθεί μέσω της αναγνώρισης του ιού με τη χρήση ενός ειδικού ανιχνευτή (αντίσωμα ή γονίδιο) (Noga, 2011). Για την κύρια μέθοδο της οριστικής διάγνωσης χρησιμοποιείται ένας ανιχνευτής γονιδίων (PCR) όπου ο εντοπισμός του ιού γίνεται

είτε από τον ιστό ή από την καλλιέργεια κυττάρων (Noga, 2011). Εναλλακτικά, πολυκλωνικός αντί – VNN ορός θα εντοπίσει όλα τα στελέχη του podavirus και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να αναγνωρίσει τα μολυσμένα κύτταρα είτε σε τμήματα ιστού ή σε κηλίδες ιστού (Munday *et al.*, 2002).

Ωστόσο, η ανίχνευση του VNN με την χρήση των PCRs πρέπει να ακολουθείται από μια άλλη μέθοδο, είτε ιστοπαθολογία με ανοσο-χρώση είτε απομόνωση του ιού σε καλλιέργεια κυττάρων, για επιβεβαίωση της διάγνωσης (Nakai *et al.*, 2009). Ταυτοποίηση του ιού σε κυτταρική καλλιέργεια που δείχνει κυτταροπαθητικά αποτελέσματα (CPE), εκτελείται είτε με μοριακή ή ορολογική δοκιμασία συμπεριλαμβανομένου ενός τεστ εξουδετέρωσης του ιού (Mori *et al.*, 2003).

4. Τρόποι πρόληψης και αντιμετώπισης της ασθένειας

4.1 Πρόληψη

Ο VNN είναι εξαιρετικά ανθεκτικός σε διάφορες περιβαλλοντικές συνθήκες και μπορεί να επιβιώσει για μεγάλο χρονικό διάστημα στο νερό της θάλασσας (Arimoto *et al.*, 1996; Frerichs *et al.*, 2000). Η νόσος εύκολα μπορεί να αναπαραχθεί σε υγιή ψάρια από: α) την συμβίωση με μολυσμένα ψάρια β) την βύθιση σε ένα εναιώρημα ιού γ) με ένεση (Nguyen *et al.*, 1996; Grotmol *et al.*, 1999; Peducasse *et al.*, 1999). Επομένως, ο τρόπος μετάδοσης της λοίμωξης είναι κατά βάση οριζόντιος μέσω της εισροής και της εκτροφής των υδάτων, και μέσω σκευών, οχημάτων, και από τις ανθρώπινες δραστηριότητες (Nakai *et al.*, 2009). Για να αποφευχθούν τέτοιου είδους οριζόντιας μετάδοσης λοίμωξης, κάποια απολυμαντικά είναι αποτελεσματικά για την αδρανοποίηση του ιού: υποχλωριώδες νάτριο, χλωριούχο βενζαλκόνιο, ιώδιο, οξύ υπεροξυγονούχο, και το όζον (Arimoto *et al.*, 1996; Frerichs *et al.*, 2000).

Υπάρχει απόδειξη κάθετης μετάδοσης της λοίμωξης από τους γεννήτορες στους απογόνους, στο λαβράκι, το Ασιατικό λαβράκι, καλκάνι, ιππόγλωσσα και σφυρίδα (Arimoto *et al.*, 1992; Comps *et al.*, 1994; Mushiake *et al.*, 1994; Watanabe *et al.*, 2000). Το πλύσιμο γονιμοποιημένων αυγών στο όζον, η επεξεργασία του θαλασσινού νερού και η απολύμανση του νερού εκτροφής με όζον, ελέγχει αποτελεσματικά την ασθένεια κατά την παραγωγή προνυμφών σε ένα ευρύ φάσμα ψαριών (Grotmol and Totland, 2000; Tsuchihashi *et al.*, 2002). Είναι σημαντικό να μειωθούν οι παράγοντες του στρες με τη βελτίωση των μεθόδων αναπαραγωγικής επαγωγής, συμπεριλαμβανομένη την εκτροφή των γεννητόρων (Mushiake *et al.*, 1994).

Ορισμένα είδη ψαριών, όπως ροφοί και το λαβράκι, είναι ιδιαίτερα ευπαθή στο RGNNV. Σε μεγάλα ηλικιακά στάδια των ψαριών ο VNN προκαλεί σοβαρές θνησιμότητες σε καλλιέργειες και στην ανοικτή θάλασσα (Nakai *et al.*, 2009). Η μόλυνση μπορεί να προκληθεί από την απόπτωση του ιού από υποκλινικά ή από την επιμένουσα λοίμωξη στα εκτρεφόμενα ή μη εκτρεφόμενα ψάρια (Chi *et al.*, 2005; Cutrin *et al.*, 2007; Sakamoto *et al.*, 2008). Ένα αποτελεσματικό σύστημα εμβολιασμού είναι απαραίτητο για την πρόληψη της νόσου κατά τη διάρκεια ανάπτυξης των ψαριών στην ιχθυοκαλλιέργεια της ανοικτής θάλασσας (Nakai *et al.*, 2009). Στη πρόληψη γίνεται ενεση με μία ανασυνδυασμένη περιβλήματος ιογενή πρωτεΐνη που ονομάζεται *Escherichia coli* (Husgard *et al.*, 2001; Tanaka *et al.*, 2001), είτε εμβολιασμος με όμοια σωματίδια του ιού-που εκφράζεται σε ένα σύστημα βακουλοϊού (Thiery *et al.*, 2006)- ή εμβολιασμος με αδρανοποιημένο ιό. Όλα τα παραπάνω είναι αποτελεσματικά στον έλεγχο της νόσου (Yamashita *et al.*, 2005). Μία πρωτογενής μόλυνση με ένα μη λοιμογόνο aquabirnavirus (Birnaviridae) κατέστειλε αποτελεσματικά μια δευτερεύουσα μόλυνση betanodavirus (Pakingking *et al.*, 2005). Διπλοι εμβολιασμοί με aquabirnavirus και αδρανοποιημένο εμβόλιο είναι

επισης πολύ χρήσιμα στην πρόληψη της ασθένειας (Yamashita *et al.*, 2009). Εμπορικά διαθέσιμα παρασκευάσματα εμβολίων δεν υπάρχουν, αλλά χρειάζονται επειγόντως.

4.1.1. Εμβολιασμός

Οι τρέχουσες ερευνητικές δραστηριότητες εστιάζονται στον εμβολιασμό ως ένα πιθανό μέσο ελέγχου (Crane and Hyatt, 2011). Ενώ η προστασία έχει επιτευχθεί σε διάφορα είδη ξενιστών χρησιμοποιώντας μια σειρά διαφορετικών συστημάτων εμβολιασμού (Sommerset *et al.*, 2005; Thiery *et al.*, 2006; Kai *et al.*, 2008; Yamashita *et al.*, 2009; Pakingking *et al.*, 2009, 2010), ένα εμπορικά διαθέσιμο εμβόλιο δεν έχει ακόμη αναπτυχθεί. Είναι πιθανό ότι ένα εμβόλιο δεν θα είναι επαρκές για τον έλεγχο αυτής της ασθένειας (Crane and Hyatt, 2011). Υπάρχει ένας αριθμός από παράγοντες που πρέπει να αντιμετωπιστούν, συμπεριλαμβανομένου του αριθμού των διαφορετικών γονότυπων / ορότυπων του ιού, του σχετικά μεγάλου αριθμού των καλλιεργούμενων ευπαθών ειδών, του εύρους των περιβαλλοντικών παραγόντων (π.χ. πρακτικές, η θερμοκρασία του νερού και εκτροφής) που συνδεονται με τις υδατοκαλλιέργειες στις διάφορες γεωγραφικές τοποθεσίες σε όλο τον κόσμο (Crane and Hyatt, 2011).

4.2 Αντιμετώπιση

Απολύμανση και καραντίνα είναι τα μόνα αποδεδειγμένα μέσα για τον έλεγχο των επιδημιών nodaviral (Noga, 2011). Η εξάλειψη της μόλυνσης έχει επιτευχθεί σε ορισμένες περιπτώσεις VNN. Στο ψάρι *Caranx vinctus*, ελέγχθηκε επιτυχώς με οξονισμό των γονιμοποιημένων ωαρίων σε συνδυασμό με την ανίχνευση και

εξάλειψη του ιού που μεταφέρουν οι γεννήτορες (Mushiake *et al.*, 1994). Τα ψάρια επίσης αφαιμάσσονται για να προσδιορισθεί αν υπάρχουν αντισώματα ορού για το nodavirus, δεδομένου ότι ο ιός δεν είναι πάντα ανιχνεύσιμος στις γονάδες (Noga, 2011). Για την οξονοποίηση, τα αυγά θα πλυθούν σε θαλασσινό νερό με υπολειμματικά επίπεδα όζοντος είτε 0,2 μ g / ml (*Caranx vinctus*) είτε 4,0 μ g / ml (χάλιμπατ του Ατλαντικού) (Noga, 2011). Στα είδη ψαριών, όπου η κάθετη μετάδοση εμφανίζεται να συμβαίνει μόνο σε χαμηλά επίπεδα γίνεται επειδή η αποθήκευση των προνυμφών βρίσκεται σε χαμηλή πυκνότητα (Noga, 2011). Κανένα εμβόλιο δεν είναι όμως εμπορικά διαθέσιμο για οποιαδήποτε ασθένεια του nodavirus.

5. Ερευνητική δραστηριότητα

Περισσότερα από 100 έγγραφα σχετικά με VNN μολύνσεις και συναφή θέματα έχουν δημοσιευθεί τις τελευταίες δύο δεκαετίες (Nakai *et al.*, 2009). Συσσωρευμένη γνώση σχετικά με την ασθένεια που αφορά το betanodavirus οδήγησε στην ανάπτυξη χρήσιμου ελέγχου και διαγνωσης (Nakai *et al.*, 2009). Ωστόσο, υπάρχουν ακόμη πολλά που πρέπει να γίνουν για να αποκαλυφθούν τα μοριακά χαρακτηριστικά του ιού, αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ψαριών υποδοχής και τον ιό, καθώς και τους μηχανισμούς μετάδοσης στο φυσικό περιβάλλον (Nakai *et al.*, 2009). Πρακτικές διαδικασίες ελέγχου για τη νόσο, ειδικά για τη μείωση σοβαρής οικονομικής ζημίας κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας net-στυλό στην ανοικτή θάλασσα, απομένουν να καθοριστούν 'δεν έχουν επιτευχθεί (Nakai *et al.*, 2009).

6. Βιβλιογραφία

- Arimoto, M., Mushiake, K., Mizuta, Y., Nakai, T., Muroga, K., & Furusawa, I. (1992) Detection of striped jack [*Pseudocaranx dentex*] nervous necrosis virus (SJNNV) by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Fish Pathology*, **27**, 191-195.
- Arimoto, M., Sato, J., Maruyama, K., Mimura, G., & Furusawa, I. (1996) Effect of chemical and physical treatments on the inactivation of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV). *Aquaculture*, **143**, (1), 15-22.
- Aspehaug, V., Devold, M., & Nylund, A. (1999) The phylogenetic relationship of nervous necrosis virus from halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *BULLETIN-EUROPEAN ASSOCIATION OF FISH PATHOLOGISTS*, **19**, 196-202.
- Azad, I. S., Shekhar, M. S., Thirunavukkarasu, A. R., Poornima, M., Kailasam, M., Rajan, J. J. S., & Ravichandran, P. (2005) Nodavirus infection causes mortalities in hatchery produced larvae of *Lates calcarifer*: first report from India. *Dis. Aquat. Organ*, **63**, 113-118.
- Barazi-Yeroulanos, L. (2010) Synthesis of Mediterranean Marine Finfish Aquaculture A Marketing and Promotion Strategy. Studies and Reviews. General Fisheries Commission for the Mediterranean. FAO No. 88, Rome, p. 198.
- Barja, J. L. (2004) Report about fish viral diseases. *Opt Méd B Et Rech*, **49**, 91-101.
- Barja, J. L. (2004) Report about fish viral diseases. *Opt Méd B Et Rech*, **49**, 91-101.
- Bechmann, I., Galea, I., & Perry, V. H. (2007) What is the blood–brain barrier (not)? *Trends in immunology*, **28**, (1), 5-11.
- Breuil, G., Mouchel, O., Fauvel, C., & Pepin, J. F. (2001) Sea bass *Dicentrarchus labrax* nervous necrosis virus isolates with distinct pathogenicity to sea bass larvae. *Diseases of aquatic organisms*, **45**, (1), 25-31.
- Brugère, C. and Ridler, N. (2004) Global aquaculture outlook in the next decades: An analysis of national aquaculture production forecasts to 2030. FAO Fisheries

Circular No. 1001, FAO, Rome, p 47. Retrieved from <http://www.fao.org/docrep/007/y5648e/y5648e00.HTM>

CAQ-GFCM. (2008) Committee on Aquaculture General Fisheries Commission for the Mediterranean Trends and Issues of Marine and Brackish Mediterranean Aquaculture. Trends and Issues of Marine and Brackish Mediterranean Aquaculture, Tirana, Albania, 17–19 September, 2008.

CAQ-GFCM. (2009) Committee on Aquaculture, General Fisheries Commission for the Mediterranean. Developing of a Strategy for Marketing and Promotion of Mediterranean Aquaculture, Tangier, Morocco, 27–28 October, 2009.

Chen, L. J., Su, Y. C., & Hong, J. R. (2009) Betanodavirus non-structural protein B1: A novel anti-necrotic death factor that modulates cell death in early replication cycle in fish cells. *Virology*, **385**, (2), 444-454.

Chérif, N., Thiéry, R., Castric, J., Biacchesi, S., Brémont, M., Thabti, F., & Hammami, S. (2009) Viral encephalopathy and retinopathy of *Dicentrarchus labrax* and *Sparus aurata* farmed in Tunisia. *Veterinary research communications*, **33**, (4), 345-353.

Chi, S. C., Wu, Y. C., & Cheng, T. M. (2005) Persistent infection of betanodavirus in a novel cell line derived from the brain tissue of barramundi *Lates calcarifer*. *Diseases of aquatic organisms*, **65**, (2), 91.

CIESM. (2007) Impact of Aquaculture on Coastal Ecosystems. CIESM Monographs No.32, Monaco. <<http://www.ciesm.org/online/monographs/lisboa07.pdf>.

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), 1-10.

Crane, M., & Hyatt, A. (2011) Viruses of fish: an overview of significant pathogens. *Viruses*, **3**, (11), 2025-2046.

Cutrín, J. M., Dopazo, C. P., Thiery, R., Leao, P., Oliveira, J. G., Barja, J. L., & Bandin, I. (2007) Emergence of pathogenic betanodaviruses belonging to the

- SJNNV genogroup in farmed fish species from the Iberian Peninsula. *Journal of fish diseases*, **30**, (4), 225-232.
- Delgado, C.L., Wada, N., Rosegrant, M.W., Meijer, S. and Ahmed, M. (2003) Fish to 2020: Supply and demand in changing global markets. World Fish Center Technical Report 62. International Food Policy Research Institute, Washington, D.C. and World Fish Center, Penang, Malaysia, pp. 236.
- Failler, P. (2006) Future prospects for fish and fishery products. Fish consumption in the European Union in 2015 and 2030 - Part 1. European overview and Part 2. Country projections. FAO Fisheries Circular. No.972/ 4. FAO, Rome.
- FAO. (2006) Food and Agriculture Organization of the United Nations. The state of world Fisheries and Aquaculture 2006, FAO Fisheries and Aquaculture Department, Rome, 2007.
- FAO. (2008) Food and Agriculture Organization of the United Nations. The state of world Fisheries and Aquaculture 2008, FAO Fisheries and Aquaculture Department, Rome, 2009.
- FAO. (2012) State of world fisheries and aquaculture. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome.
- Fenner, B. J., Thiagarajan, R., Chua, H. K., & Kwang, J. (2006) Betanodavirus B2 is an RNA interference antagonist that facilitates intracellular viral RNA accumulation. *Journal of virology*, **80**, (1), 85-94.
- 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 (*Dicentrarchus labrax*) neuropathy nodavirus. *Aquaculture*, **185**, (1), 13-24.
- Glazebrook, J. S., Heasman, M. P., & Beer, S. W. (1990) Picorna-like viral particles associated with mass mortalities in larval barramundi, *Lates calcarifer* Bloch. *Journal of Fish Diseases*, **13**, (3), 245-249.
- Greenwood, J., Heasman, S. J., Alvarez, J. I., Prat, A., Lyck, R., & Engelhardt, B. (2011) Review: leucocyte–endothelial cell crosstalk at the blood–brain barrier: a

- prerequisite for successful immune cell entry to the brain. *Neuropathology and applied neurobiology*, **37**, (1), 24-39.
- Grigorakis, K., & Rigos, G. (2011) Aquaculture effects on environmental and public welfare—the case of Mediterranean mariculture. *Chemosphere*, **85**, (6), 899-919.
- Grotmol, S., & Totland, G. K. (2000) Surface disinfection of Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* eggs with ozonated sea-water inactivates nodavirus and increases survival of the larvae. *Dis. Aquat. Org.*, **39**, 89-96.
- Grotmol, S., Bergh, Ø., & Totland, G. K. (1999) Transmission of viral encephalopathy and retinopathy (VER) to yolk-sac larvae of the Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus*: occurrence of nodavirus in various organs and a possible route of infection. *Dis. Aquat. Org.*, **36**, 95-106.
- Grotmol, S., Totland, G.K., Kvellestad, A., Fjell, K., Olsen, A.B. (1995) Mass mortalities of larval and juveniles hatchery-reared halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) associated with the presence of virus-like particles in vacuolated lesions in the central nervous system and retina. *Eur. Assoc. Fish Pathol*, **15**, 176–180.
- Hata, N., Okinaka, Y., Iwamoto, T., Kawato, Y., Mori, K. I., & Nakai, T. (2010) Identification of RNA regions that determine temperature sensitivities in betanodaviruses. *Archives of virology*, **155**, (10), 1597-1606.
- Hodneland, K., Garcia, R., Balbuena, J. A., Zarza, C., & Fouz, B. (2011) Real-time RT-PCR detection of betanodavirus in naturally and experimentally infected fish from Spain. *Journal of fish diseases*, **34**, (3), 189-202.
- Husgard, S., Grotmol, S., Hjeltnes, B. K., Rødseth, O. M., & Biering, E. (2001) Immune response to a recombinant capsid protein of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) in turbot *Scophthalmus maximus* and Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus*, and evaluation of a vaccine against SJNNV. *Dis. Aquat. Org*, **45**, 33-44.
- Iwamoto, T., Nakai, T., Mori, K. I., Arimoto, M., & Furusawa, I. (2000) Cloning of the fish cell line SSN-1 for piscine nodaviruses. *Diseases of Aquatic Organisms*, **43**, (2), 81-89.

- Johnson, S. C., Sperker, S. A., Leggiadro, C. T., Groman, D. B., Griffiths, S. G., Ritchie, R. J., & Cusack, R. R. (2002) Identification and characterization of a piscine neuropathy and nodavirus from juvenile Atlantic cod from the Atlantic coast of North America. *Journal of Aquatic Animal Health*, **14**, (2), 124-133.
- Kai, Y. H., & Chi, S. C. (2008) Efficacies of inactivated vaccines against betanodavirus in grouper larvae (*Epinephelus coioides*) by bath immunization. *Vaccine*, **26**, (11), 1450-1457.
- Kang, S. S., & McGavern, D. B. (2010) Microbial induction of vascular pathology in the CNS. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, **5**, (3), 370-386.
- 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* (L.). *Journal of Fish Diseases*, **20**, (2), 145-151.
- Magnadottir, B. (2010) Immunological control of fish diseases. *Marine biotechnology*, **12**, (4), 361-379.
- Mori, K. I., Mangyoku, T., Iwamoto, T., Arimoto, M., Tanaka, S., & Nakai, T. (2003) Serological relationships among genotypic variants of betanodavirus. *Diseases of aquatic organisms*, **57**, (1/2), 19-26.
- Mori, K. I., Nakai, T., Muroga, K., Arimoto, M., Mushiake, K., & Furusawa, I. (1992) Properties of a new virus belonging to nodaviridae found in larval striped jack (*Pseudocaranx dentex*) with nervous necrosis. *Virology*, **187**, (1), 368-371.
- Munday, B. L., & Nakai, T. (1997) Nodaviruses as pathogens in larval and juvenile marine finfish. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **13**, (4), 375-381.
- Munday, B. L., Kwang, J., & Moody, N. (2002) Betanodavirus infections of teleost fish: a review. *Journal of Fish Diseases*, **25**, (3), 127-142.
- Munday, B. L., Langdon, J. S., Hyatt, A., & Humphrey, J. D. (1992) Mass mortality associated with a viral-induced vacuolating encephalopathy and retinopathy of larval and juvenile barramundi, *Lates calcarifer* Bloch. *Aquaculture*, **103**, (3), 197-211.

- Mushiake, K., Nishizawa, T., Nakai, T., Furusawa, I., & Muroga, K. (1994) Control of VNN in striped jack-selection of spawners based on the detection of SJNNV gene by Polymerase Chain-Reaction (PCR). *Fish Pathology*, **29**, (3), 177-182.
- Nakai, T., Sugaya, T., Nishioka, T., Mushiake, K., & Yamashita, H. (2009) Current knowledge on viral nervous necrosis (VNN) and its causative betanodaviruses.
- Nguyen, H. D., Nakai, T., & Muroga, K. (1996) Progression of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) infection in naturally and experimentally infected striped jack *Pseudocaranx dentex* larvae. *Diseases of Aquatic Organisms*, **24**, 99-105.
- 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. *Applied and Environmental Microbiology*, **63**, (4), 1633-1636.
- Noga, E. J. (2011) Fish disease: diagnosis and treatment. *John Wiley & Sons*.
- Nylund, A., Karlsbakk, E., Nylund, S., Isaksen, T. E., Karlsen, M., Korsnes, K., & Ottem, K. F. (2008) New clade of betanodaviruses detected in wild and farmed cod (*Gadus morhua*) in Norway. *Archives of virology*, **153**, (3), 541-547.
- Pakingking Jr, R., Seron, R., Dela Peña, L., Mori, K., Yamashita, H., & Nakai, T. (2009) Immune responses of Asian sea bass, *Lates calcarifer* Bloch, against an inactivated betanodavirus vaccine. *Journal of fish diseases*, **32**, (5), 457-463.
- Pakingking, R., Bautista, N. B., de Jesus-Ayson, E. G., & Reyes, O. (2010) Protective immunity against viral nervous necrosis (VNN) in brown-marbled grouper (*Epinephelus fuscogutattus*) following vaccination with inactivated betanodavirus. *Fish & shellfish immunology*, **28**, (4), 525-533.
- Pakingking, R., Mori, K. I., Sugaya, T., Oka, M., Okinaka, Y., & Nakai, T. (2005) Aquabirnavirus-induced protection of marine fish against piscine nodavirus infection. *Fish Pathology*, **40**, (3), 125-131.
- Pavlidis, M., & Mylonas, C. (Eds.). (2011) Sparidae: Biology and aquaculture of *gilthead sea bream* and other species. *John Wiley & Sons*.
- Peducasse, S., Castric, J., Thiery, R., Jeffroy, J., Le Ven, A., & Baudin Laurencin, F. (1999) Comparative study of viral encephalopathy and retinopathy in juvenile sea

- bass *Dicentrarchus labrax* infected in different ways. *Diseases of aquatic organisms*, **36**, 11-20.
- Ransangan, J., & Manin, B. O. (2010) Mass mortality of hatchery-produced larvae of Asian seabass, *Lates calcarifer* (Bloch), associated with viral nervous necrosis in Sabah, Malaysia. *Veterinary microbiology*, **145**, (1), 153-157.
- Raynard, R., Wahli, T., Vatsos, I., & Mortensen, S. (2007) Review of disease interactions and pathogen exchange between farmed and wild finfish and shellfish in Europe. *Veterinærmedisinsk Oppdragscenter AS*.
- Rodger, H. D. (2010) *Fish Disease Manual*.
- Sakamoto, T., Okinaka, Y., Mori, K., Sugaya, T., Nishioka, T., Oka, M., & Nakai, T. (2008) Phylogenetic analysis of betanodavirus RNA2 identified from wild marine fish in oceanic regions. *Fish Pathology*, **43**, (1), 19.
- Sommerset, I., Skern, R., Biering, E., Bleie, H., Fiksdal, I. U., Grove, S., & Nerland, A. H. (2005) Protection against Atlantic halibut nodavirus in turbot is induced by recombinant capsid protein vaccination but not following DNA vaccination. *Fish & shellfish immunology*, **18**, (1), 13-29.
- Tanaka, S., Mori, K., Arimoto, M., Iwamoto, T., & Nakai, T. (2001) Protective immunity of sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus* Thunberg, against experimental viral nervous necrosis. *Journal of Fish Diseases*, **24**, (1), 15-22.
- Thiery, R., Cozien, J., Cabon, J., Lamour, F., Baud, M., & Schneemann, A. (2006). Induction of a protective immune response against viral nervous necrosis in the European sea bass *Dicentrarchus labrax* by using betanodavirus virus-like particles. *Journal of virology*, **80**, (20), 10201-10207.
- Tsuchihashi, Y., Kuriyama, I., Kuromiya, Y., Kashiwagi, M., & Yoshioka, M. (2002) Control of viral nervous necrosis (VNN) in seedling production of sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus*. *Suisanzoshoku*, **50**, 355-361 (in Japanese with English abstract).
- Ucko, M., Colorni, A., & Diamant, A. (2004) Nodavirus infections in Israeli mariculture. *Journal of fish diseases*, **27**, (8), 459-469.

- Watanabe, K. I., Nishizawa, T., & Yoshimizu, M. (2000) Selection of brood stock candidates of barfin flounder using an ELISA system with recombinant protein of *barfin flounder* nervous necrosis virus. *Diseases of aquatic organisms*, **41**, (3), 219-223.
- Yamashita, H., Fujita, Y., Kawakami, H., Nakai, T. (2005) The efficacy of inactivated virus vaccine against viral nervous necrosis (VNN). *Fish Pathology*, **40**, (1), 15-21.
- Yamashita, H., Mori, K., & Nakai, T. (2009) Protection conferred against viral nervous necrosis by simultaneous inoculation of aquabirnavirus and inactivated betanodavirus in the sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus* (Thunberg). *Journal of fish diseases*, **32**, (2), 201-210.