ESCUELA DE DOCTORADO
INTERNACIONAL DE LA USC

Lucía
Vázquez Salgado

Tesis doctoral

Epidemiología y control de infecciones causadas por betanodavirus

Santiago de Compostela, 2022

Programa de Doctorado en Avances en Biología Microbiana y Parasitaria

TESIS DE DOCTORADO

EPIDEMIOLOGÍA Y CONTROL DE INFECCIONES CAUSADAS POR BETANODAVIRUS

Lucía Vázquez Salgado

ESCUELA DE DOCTORADO INTERNACIONAL DE LA UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA
PROGRAMA DE DOCTORADO EN AVANCES EN BIOLOGÍA MICROBIANA Y PARASITARIA

SANTIAGO DE COMPOSTELA
2022

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

DECLARACIÓN DEL AUTOR/A DE LA TESIS

D./Dña. **Lucía Vázquez Salgado**

Título de la tesis: **Epidemiología y control de infecciones causadas por betanodavirus.**

Presento mi tesis, siguiendo el procedimiento adecuado al Reglamento y declaro que:

1) La tesis abarca los resultados de la elaboración de mi trabajo.

2) De ser el caso, en la tesis se hace referencia a las colaboraciones que tuvo este trabajo.

3) Confirmo que la tesis no incurre en ningún tipo de plagio de otros autores ni de trabajos presentados por mí para la obtención de otros títulos.

4) La tesis es la versión definitiva presentada para su defensa y coincide la versión impresa con la presentada en formato electrónico.

Y me comprometo a presentar el Compromiso Documental de Supervisión en el caso que el original no esté depositado en la Escuela.

En **Santiago de Compostela**, 11 de julio de 2022.

Firma electrónica

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR / TUTOR DE TESIS

Epidemiología y control de infecciones por betanodavirus

D./Dª. **Isabel Bandín Matos**

INFORMA/N:

Que la presente tesis, se corresponde con el trabajo realizado por D/Dª. Lucía Vázquez Salgado, bajo mi dirección/tutorización, y autorizo su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como director de esta no incurre en las causas de abstención establecidas en la Ley 40/2015.

De acuerdo con lo indicado en el Reglamento de Estudios de Doctorado, declara también que la presente tesis es idónea para ser defendida en base a la modalidad de Monográfica con reproducción de publicaciones, en la que la participación del doctorando/a fue decisiva para su elaboración y las publicaciones se ajustan al Plan de Investigación.

En Santiago de Compostela, 20 de julio de 2022.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Esta tesis doctoral fue financiada por la Xunta de Galicia, por el proyecto ED431C2018/18, y por el Interreg VA España-Portugal Programa de Cooperación (POCTEP) 2014-2020, Proyecto 0474-BlueBioLab, cofinanciado por los Fondos FEDER, de la UE.





USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

AGRADECIMIENTOS

El camino recorrido hasta escribir estas líneas ha estado lleno de gente esencial para alcanzar la meta.

En primer lugar, me gustaría agradecer a mi directora Isa y a Carlos por confiar en mi para llevar a cabo este trabajo y darme la oportunidad de continuar mi formación académica.

Gracias también a mis compañeros de laboratorio Ali, Carmen, Javi y Johnny, por su infinita paciencia, sabiduría y ayuda incondicional, y porque han sido fundamentales para llegar hasta aquí. A Sandra, por sus consejos tan valiosos y cada palabra de ánimo, y a Yulema, por el apoyo recibido aún en la distancia. También a Sol, por toda la ayuda prestada.

A mis tutores de estancia, Vitor Vasconcelos y Anna Toffan por permitirme complementar mi formación en su laboratorio, y a los compañeros del Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (Alessandra, Andrea y Francesco) por habérmelo puesto tan fácil y hacerme sentir como en casa.

A los demás compañeros del instituto de acuicultura, Alba, Ana, Diego, Gabriel, Laura, Marta, Mateus, Saqr y Xose, por todas esas horas con una/s caña/s delante que son la mejor terapia cuando los ánimos flojean.

A Angela, Camino, Cris, Dani, Pablo y Santi, por cada palabra de aliento y ayudarme a evadirme del laboratorio.

Por último, gracias a mis padres y abuelos, por permitirme alcanzar mis sueños y apoyarme en todas las decisiones. A Martín, Noly y Nico. Y a Álvaro, mi persona vitamina, por acompañarme en este camino.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

DECLARACIÓN DEL MANEJO RESPONSABLE DE LOS PECES

Los peces utilizados en las infecciones experimentales realizadas durante el desarrollo de esta tesis doctoral se manejaron siguiendo de forma estricta las directrices de la UE (directiva 2010/63/UE).

El protocolo para los experimentos realizados con juveniles de lenguado y dorada en las instalaciones del acuario de la Universidade de Santiago de Compostela fue aprobado por el Comité Gallego para el bienestar de los animales de experimentación y por la Xunta de Galicia, con número de identificación 15004/13/00.

Los experimentos realizados con larvas de lubina en las instalaciones del acuario del Istituto Zooprofilattico Sperimentalle delle Venezie (Italia) fueron aprobados por el Ministerio italiano de Salud, con número de autorización 1018/2020-PR.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Si caminas solo, llegarás más rápido.
Si caminas acompañado, llegarás más lejos.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ÍNDICE

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ÍNDICE

Resumen i
Summary ix
Introducción
I. Estado mundial de la acuicultura 3
II. Familia *Nodaviridae* – Virus de la Necrosis Nerviosa Viral (VNNV) 6
II.1. Contexto histórico 7
II.2. Características del VNNV 8
II.3. Clasificaciones del VNNV 9
II.3.1. Clasificación filogenética del Género *Betanodavirus* 10
II.3.2. Otras clasificaciones 12
II.4. Epidemiología 13
II.4.1. Vertebrados del medio marino 13
II.4.2. Vertebrados de agua dulce 22
II.4.3. Invertebrados 23
II.5. Transmisión 26
II.6. Especificidad de huésped 27
II.7. La enfermedad: Encefalopatía y Retinopatía Viral (ERV) 28
II.7.1. Signos clínicos 28
II.7.2. Lesiones histológicas 29
II.8. Vías de infección y diseminación viral en el individuo 30
II.9. Interacción VNNV – célula huésped 32
II.10. Ciclo viral y efecto del virus sobre el ciclo celular 33
II.11. Respuesta inmune del huésped 36
II.12. Diagnóstico del VNNV 39
II.12.1. Técnicas histológicas 39
II.12.2. Técnicas celulares 40
II.12.3. Técnicas serológicas 42
II.12.4. Técnicas moleculares 43
II.12.5. Técnicas de microscopía 45
II.13. Mecanismos de prevención y control 46
II.13.1. Vacunas 47
Objetivos 55
Aims 59

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Capítulo I. Estudio epidemiológico de la prevalencia del VNNV en bancos naturales de peces en el océano Atlántico
1.1. Introducción 63
1.2. Material y Métodos 64
1.2.1. Muestreo de peces 64
1.2.2. Línea celular 65
1.2.3. Procesado de las muestras 65
1.2.4. Cuantificación de carga viral 66
1.2.4.1. Extracción de ARN total 66
1.2.4.2. Transcripción inversa 66
1.2.4.3. PCR cuantitativa (qPCR) 67
1.2.4.4. TaqMan PCR 67
1.2.5. Propagación de los aislados y secuenciación 68
1.2.6. Análisis filogenético 70
1.2.7. Infección experimental 72
1.2.8. Procesado de las muestras y análisis virológico 73
1.2.9. Análisis estadístico 73
1.3. Resultados 73
1.3.1. Análisis virológico 73
1.3.2. Caracterización filogenética 75
1.3.3. Porcentaje de homología nucleotídica 79
1.3.4. Comparación aminoacídica 81
1.3.5. Infección experimental en lenguado 85
1.4. Discusión 86
Capítulo II. Papel del zooplancton en la transmisión del VNNV: infección de larvas de lubina mediante rotíferos
2.1. Introducción 93
2.2. Material y Métodos 94
2.2.1. Cepa viral: propagación y titulación 94
2.2.2. Inoculación del VNNV en cultivos de rotíferos 94
2.2.3. Infección experimental de larvas de lubina 95
2.2.4. Procesado de las muestras para cuantificación de carga viral mediante titulación 96

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

2.2.5. Procesado de las muestras para cuantificación de carga viral mediante RT-qPCR 97
2.25.1. Extracción de ARN 97
2.2.5.2. Transcripción inversa (RT-PCR) 98
2.2.5.3. PCR cuantitativa (qPCR) 98
2.2.6. Ensayo de fluorescencia indirecta (IFA) en rotíferos 98
2.2.7. Tinción inmunohistoquímica (IHC) de rotíferos y larvas 99
2.2.8. Análisis estadístico 99
2.3. Resultados 99
2.3.1. Acumulación de VNNV en el interior de los rotíferos 99
2.3.1.1. IFA 99
2.3.1.2. Inmunohistoquímica 100
2.3.1.3. Carga viral: $TCID_{50}$ y número de copias de ARN1 101
2.3.2. Infección de las larvas 102
2.3.2.1. Cuantificación de carga viral mediante titulación 103
2.3.2.2. Cuantificación de carga viral mediante RT-qPCR 104
2.3.2.3. Análisis histológico y tinción IHC 105
2.4. Discusión 108

Capítulo III. Papel del zooplancton en la transmisión del VNNV: infección de larvas de lenguado mediante Artemia

3.1. Introducción 113
3.2. Material y Métodos 114
3.2.1. Cepa viral: propagación y titulación 114
3.2.2. Cultivo de microalgas 114
3.2.3. Inoculación del VNNV en cultivos de *Artemia* 115
3.2.4. Infección experimental en larvas de lenguado 116
3.2.5. Procesado de las muestras para análisis virológico 117
3.2.5.1. Cuantificación de carga viral mediante RT-qPCR 117
3.2.6. Ensayo de fluorescencia indirecta en nauplios de *Artemia* 117
3.2.7. Ensayo de la actividad antiviral de *Isochrysis galbana* 118
3.2.8. Análisis estadístico 118
3.3. Resultados 118
3.3.1. Acumulación del VNNV en los metanauplios de *Artemia* 118
3.3.1.1. Detección mediante IFA 118

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3.3.1.2. Carga viral en los cultivos de *Artemia* no enriquecidos con microalgas 119
3.3.1.3. Carga viral en los cultivos de *Artemia* enriquecidos con microalgas 120
3.3.2. Infección de las larvas de lenguado 121
3.3.3. Ensayo de la actividad antiviral de *Isochrysis galbana* 124
3.4. Discusión 125

Capítulo IV. Efecto de la densidad de cultivo en la infección por VNNV en lenguado

4.1. Introducción 133
4.2. Material y Métodos 134
4.2.1. Ensayos de infección en peces 134
4.2.2. Análisis virológico 136
4.2.3. Expresión de genes relacionados con el estrés 136
4.2.4. Concentración de compuestos derivados del nitrógeno 137
4.2.5. Análisis estadístico 137
4.3. Resultados 137
4.3.1. Mortalidad acumulada y sintomatología 137
4.3.2. Cuantificación de carga viral en los peces muertos y los supervivientes al final del ensayo 138
4.3.3. Carga viral en los peces muestreados durante el experimento 140
4.3.4. Carga viral en el agua de cultivo 142
4.3.5. Concentración de los compuestos derivados del nitrógeno 144
4.3.6. Expresión de genes relacionados con el estrés 145
4.4. Discusión 146

Capítulo V. Transmisión del VNNV entre lenguados y doradas, y efecto del estrés en la infección

5.1. Introducción 155
5.2. Material y Métodos 156
5.2.1. Ensayos de infección en peces 156
5.2.2. Análisis virológico y cuantificación viral 158
5.2.3. Expresión del gen *hsp*70 158
5.2.4. Análisis estadístico 158
5.3. Resultados 158

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5.3.1. Curvas de mortalidad en los ensayos de susceptibilidad de dorada y lenguado 158
5.3.2. Cinética de replicación del VNNV en las doradas y lenguados infectados en los ensayos de susceptibilidad 160
5.3.3. Ensayos de transmisión interespecíficos 161
5.3.3.1. Cohabitación 1: lenguados infectados cohabitando con doradas sanas 161
5.3.3.2. Cohabitación 2: doradas infectadas cohabitando con lenguados sanos 163
5.3.4. Expresión del gen *hsp*70 165
5.4. Discusión 167

Capítulo VI. Modulación de la viabilidad del VNNV por la salinidad y la temperatura del agua

6.1. Introducción 173
6.2. Material y Métodos 174
6.2.1. Cepas virales y propagación 174
6.2.2. Tratamientos del agua y ensayos de incubación 174
6.2.3. Cuantificación de carga viral: $TCID_{50}$ y copias de ARN/ml 176
6.2.4. Aislamiento bacteriano y caracterización 176
6.2.5. Análisis estadístico 176
6.3. Resultados 176
6.3.1. Viabilidad en agua de mar de baja salinidad (LS) 176
6.3.2. Viabilidad de la cepa recombinante en agua de mar de alta salinidad (HS) 179
6.3.3. Viabilidad en condiciones de acuario 180
6.3.4. Viabilidad en medio de cultivo L-15 180
6.3.5. Cuantificación del número de copias genómicas 183
6.3.6. Aislamiento de colonias bacterianas y caracterización 184
6.4. Discusión 184

Conclusiones 191
Conclusions 195
Referencias bibliográficas 199
Anexos 247

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ÍNDICE DE FIGURAS

Introducción

Figura 1. Producción acuícola mundial de animales acuáticos y algas entre 1990-2018. (FAO, 2020). 4

Figura 2. Evolución de la infección por VNNV en la línea E-11. 41

Capítulo I.

Figura I.1. Mapa de la zona 27 de pesca descrita por la FA. 65

Figura I.2. Representación filogenética de la molécula de ARN1. 76

Figura I.3. Representación filogenética de la molécula de ARN2. 77

Figura I.4. Representación filogenética de la molécula de ARN1 (A) y ARN2 (B) de los cuatro aislados obtenidos en este capítulo. 78

Figura I.5. Cuantificación de la replicación a 18 ºC y 22 ºC. 85

Capítulo II.

Figura II.1. Imágenes de IFA de los rotíferos inoculados con VNNV. 100

Figura II.2. IHC de los rotíferos. 101

Figura II.3. Cinética de infección por el VNNV en los rotíferos. 102

Figura II.4. Título viral obtenido en las larvas infectadas por baño y por vía oral utilizando rotíferos inoculados con VNNV. 103

Figura II.5. Cuantificación de carga viral mediante RT-qPCR en las larvas infectadas por baño y las alimentadas inoculados con rotíferos VNNV. 104

Figura II.6. IHC de las larvas de lubina infectadas mediante baño y alimentadas con rotíferos inoculados con VNNV. 106

Capítulo III.

Figura III.1. Tinción inmunofluorescente de nauplios de *Artemia* inoculados con VNNV. 119

Figura III.2. Carga viral cuantificada en los nauplios de *Artemia* inoculados con VNNV, y sin enriquecimiento con microalgas. 120

Figura III.3. Carga viral cuantificada en los nauplios de *Artemia* inoculados con VNNV 24h y enriquecidos. 121

Figura III.4. Mortalidad acumulada en las larvas de lenguado tras la infección oral con Artemia y por baño. 122

Figura III.5. Carga viral detectada en las larvas muestreadas. 123

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Figura III.6. Carga viral expresada como $TCID_{50}$/ml tras la incubación del VNNV en medio de cultivo de las microalgas. 124
Figura III.7. Carga viral expresada como copias de ARN/ml tras la incubación del VNNV en medio de cultivo de las microalgas. 125

Capítulo IV.

Figura IV.1. Representación de las cuatro densidades de cultivo. 135
Figura IV.2. Mortalidad acumulada (%) en el lenguado. 138
Figura IV.3. Carga viral en los peces muertos y en los supervivientes. 139
Figura IV.4. Carga viral en los peces muestreados. 141
Figura IV. 5. Carga viral en el agua de cultivo de los tanques. 143

Capítulo V.

Figura V.1. Esquema de la cohabitación de lenguados y doradas. 157
Figura V.2. Curvas de mortalidad en los peces infectados con la cepa Ss160.03. 159
Figura V.3. Curvas de mortalidad en los peces infectados con la cepa Sa382.17. 159
Figura V.4. Cuantificación de carga viral en los peces de los ensayos de susceptibilidad. 160
Figura V.5. Curvas de mortalidad acumulada (%) en el ensayo de cohabitación 1. 161
Figura V.6. Carga viral cuantificada en el ensayo de cohabitación 1. 162
Figura V.7. Porcentaje de mortalidad acumulada en el ensayo de cohabitación 2. 164
Figura V.8. Carga viral detectada en el ensayo de cohabitación 2. 165
Figura V.9. Expresión relativa del gen *hsp*70 en los ensayos de cohabitación. 166

Capítulo VI.

Figura VI.1. Curva de decaimiento a 15 ºC en agua de mar (LS). 177
Figura VI.2. Curva de decaimiento a 20 ºC en agua de mar (LS). 178
Figura VI.3. Curva de decaimiento a 25 ºC en agua de mar (LS). 178
Figura VI.4. Curva de decaimiento a 30 ºC en agua de mar (LS). 179
Figura VI.5. Tendencia de la RG/SJ en la incubación en agua HS. 180
Figura VI.6. Curva de decaimiento a 15 ºC en medio L-15. 181

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Figura VI.7. Curva de decaimiento a 20 ºC en medio L-15. 181
Figura VI.8. Curva de decaimiento a 25 ºC en medio L-15. 182
Figura VI.9. Curva de decaimiento a 30 ºC en medio L-15. 183

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ÍNDICE DE TABLAS

Introducción

Tabla 1. Relación de virus de peces, según el ICTV. 5
Tabla 2. Relación de especies de peces marinos en las que se ha aislado el VNNV. 15
Tabla 3. Relación de especies de agua dulce afectadas por el VNNV. 22
Tabla 4. Lista de especies de invertebrados en las que se ha detectado el VNNV. 24
Tabla 5. Lista de líneas celulares susceptibles al VNNV. 41
Tabla 6. Tipos de vacunas desarrolladas para el VNNV. 48

Capítulo I.

Tabla I.1. Relación de especies capturadas. 64
Tabla I.2. Relación de cebadores y sondas para el genotipado mediante TaqMan PCR. 68
Tabla I.3. Lista de cebadores utilizados para la secuenciación de los aislados de VNNV obtenidos en este trabajo. 69
Tabla I.4. Relación de cepas utilizadas para la caracterización filogenética y aminoacídica de los aislados. 71
Tabla I.5. Porcentaje de individuos positivos para el VNNV. 74
Tabla I.6. Relación de genotipos de VNNV detectados en cada especie. 74
Tabla I.7. Números de acceso a GenBank de la secuencia de ambos segmentos genómicos de los aislados. 75
Tabla I.8. Porcentaje de identidad por pares del ORF del ARN1. 80
Tabla I.9. Porcentaje de identidad por pares del ORF del ARN2. 81
Tabla I.10. Cambios aminoacídicos en la proteína RdRp. 82
Tabla I.11. Cambios aminoacídicos en la proteína de la cápside. 84

Capítulo II.

Tabla II.1. Resultados de IHC y del análisis histológico de las larvas de lubina alimentadas con rotíferos inoculados con VNNV. 107
Tabla II.2. Resultados de la tinción IHC y el análisis histológico del SNC y la retina de las larvas infectadas por baño con VNNV. 108

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Capítulo IV.

Tabla IV.2. Secuencia de cebadores para la cuantificación de los genes relacionados por el estrés (*hsp*70, *gr*1, *pepck* y 18S). 136
Tabla IV.3. Concentración de nitritos y amonio total en el agua. 144
Tabla IV.4. Magnitud de la expresión de los genes *hsp*70, *gr*1 y *pepck* en los peces sacrificados. 145
Tabla IV.4. Magnitud de la expresión de los genes *hsp*70, *gr*1 y *pepck* en los peces muertos. 146

Capítulo VI.

Tabla VI.1. Parámetros que afectan a la viabilidad del VNNV. 174
Tabla VI.2. Carga viral (copias de ARN1/ml) de las 3 cepas de VNNV. 183

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

RESUMEN

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

RESUMEN

El Virus de la Necrosis Nerviosa Viral (VNNV) es un importante patógeno acuático de distribución mundial, perteneciente al Género *Betanodavirus* (F. *Nodaviridae*). Posee un genoma compuesto por dos moléculas de ARN monocatenal y de sentido positivo, denominadas ARN1 (3,1 kb) y ARN2 (1,4 kb), que contienen el ORF de la proteína polimerasa (RNA dependent RNA polymerase, RdRp) y de la proteína de la cápside, respectivamente. Durante el proceso infeccioso, se sintetiza una tercera molécula de ARN subgenómico, denominada ARN3, a partir de la hebra molde del ARN1. El ARN3 contiene el ORF de dos proteínas no estructurales, denominadas B1 y B2, cuyas funciones facilitan la replicación viral mediante la detención del ciclo celular e inhibición de la apoptosis.

Los betanodavirus poseen una región hipervariable en el ARN2, denominada T4, a partir de la cual se diferencian los 4 genotipos: BFNNV (Barfin Flounder Nervous Necrosis Virus), RGNNV (Redspotted Grouper Nervous Necrosis Virus), SJNNV (Striped Jack Nervous Necrosis Virus) y TPNNV (Tiger Puffer Nervous Necrosis Virus). También se ha descrito la recombinación de forma natural entre segmentos genómicos de los genotipos RGNNV y SJNNV, en ambas combinaciones (RGNNV/SJNNV y SJNNV/RGNNV). Las cepas BFNNV se distribuyen principalmente en especies de aguas frías del Atlántico Norte (Europa y EEUU) mientras que las RGNNV provocan epizootias mayoritariamente en aguas templadas o cálidas; el tipo SJNNV se localizó inicialmente en el este asiático, aunque se han descrito también en el Sur de Europa, y finalmente el genotipo TPNNV fue descrito una única vez en aguas de Japón. En cuanto a los recombinantes, en los últimos 15 años se han descrito numerosas cepas con esa combinación

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

genómica, la mayoría tipo RGNNV/SJNNV, en aguas del sur de Europa y especialmente en la región mediterránea.

El VNNV es el agente etiológico de una neuropatología denominada Encefalopatía y Retinopatía Viral (ERV) o Necrosis Nerviosa Viral (NNV), que cursa con vacuolización y necrosis de las células nerviosas del huésped, tanto del sistema nervioso central, como de la retina o la médula espinal. Afecta a un amplio rango de especies de peces, y es especialmente grave durante las primeras etapas de desarrollo. En la mayoría de los casos se asocia con peces de ambiente marino, aunque también ha sido detectado en peces de agua dulce y en invertebrados. La vía de transmisión más común del VNNV es la horizontal a través de la columna de agua, desde individuos infectados hacia los sanos, aunque también se puede transmitir de forma vertical hacia la progenie.

A pesar de la severidad de la ERV, hasta la fecha, no se han descrito métodos profilácticos efectivos que palíen los efectos del VNNV, o que eviten su introducción en las zonas de cría de las plantas de acuicultura. Por tanto, esta tesis doctoral que tiene por título "**Epidemiología y control de infecciones causadas por Betanodavirus**" fue concebida con el objetivo de investigar posibles vías de entrada del patógeno en las instalaciones y analizar los factores implicados en la aparición de brotes de enfermedad para diseñar medidas de control efectivas. Está compuesta por 6 capítulos, cuyos resultados están publicados en revistas de alto impacto, excepto el primero, que se encuentra en preparación.

En el capítulo I "*Estudio epidemiológico de la prevalencia del VNNV en bancos naturales de peces en el Océano Atlántico*" se aborda un análisis virológico de peces capturados en las costas gallegas. El VNNV se detectó en un 1,72 % de los individuos analizados, incluyendo especies en las que todavía no había sido hallado. Los únicos genotipos de VNNV detectados fueron el SJNNV y el recombinante RGNNV/SJNNV, casi en la misma proporción y, además, se obtuvieron 4 aislados RGNNV/SJNNV a partir de sardina y caballa. Estos aislados presentan diversos cambios con respecto a los genotipos parentales y a otros recombinantes aislados de lenguado y dorada tanto en la secuencia de aminoácidos de la polimerasa como de la

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

proteína de la cápside, localizados en regiones responsables de la adaptación a la temperatura, la formación del complejo de replicación o la interacción con las células del huésped, que podrían ser responsables de las diferentes cinéticas de replicación observadas en las infecciones experimentales en lenguado.

En los siguientes dos capítulos se evalúa la transmisión del VNNV mediante la ruta oral, a través de dos invertebrados marinos (rotíferos y *Artemia*) que se utilizan habitualmente como alimento de larvas de peces marinos. En el capítulo II, "*Papel de zooplancton en la transmisión del VNNV: infección de larvas de lubina mediante rotíferos*" se muestran los resultados de la infección de larvas de esta especie de 12 días post eclosión (dpe) utilizando como primer alimento un cultivo de rotíferos portadores del virus. En primer lugar se demuestra que el VNNV se mantiene viable en el interior de los rotíferos durante 48 horas, lo que apoya el papel de estos invertebrados como vectores de la infección. Además, las larvas alimentadas con una sola dosis de rotíferos portadores de VNNV, presentan signos de ERV y niveles de mortalidad similares a las infectadas por baño. Asimismo, en ambas rutas de infección se alcanzan niveles semejantes de replicación viral aunque, se observa un retraso en el curso de la infección cuando se produce por vía oral. En el capítulo III "*Papel de zooplancton en la transmisión del VNNV: infección de larvas de lenguado mediante Artemia*" se demuestra el potencial del crustáceo *Artemia salina* , utilizado como segundo alimento en el cultivo larvario de transmitir el VNNV a larvas de lenguado de 30 dpe. Al igual que en el capítulo anterior, se demuestra que el VNNV se mantiene viable en el interior del crustáceo aunque en este caso por un período superior, hasta 8 días, y que las larvas de lenguado alimentadas con un cultivo de artemias portadoras de VNNV desarrollan signos de ERV y porcentajes de mortalidad equivalentes a los de la infección por baño. Por otra parte, los datos experimentales sugieren que las microalgas utilizadas comúnmente para el enriquecimiento del zooplancton, como *Isochrysis galbana* o *Nannochloropsis gaditana*, producen y liberan al medio acuático alguna/s sustancia/s que afectan de forma significativa la viabilidad del VNNV. Por lo tanto, los resultados obtenidos en ambos capítulos destacan la importancia de establecer estrictos controles rutinarios sobre el alimento vivo utilizado en

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

criaderos de acuicultura para prevenir la introducción del VNNV en las instalaciones.

Los siguientes capítulos proporcionan nuevas aproximaciones acerca de los brotes de ERV en las plantas de acuicultura. En los últimos años debido a la necesidad de aumentar la producción de pescado, se ha producido un incremento en la ratio de peces, y se han probado nuevas técnicas como la cohabitación de especies diferentes en el mismo espacio. En el capítulo IV "E*fecto de la densidad de cultivo en la infección por el VNNV en lenguado*" se exponen los efectos del cultivo en altas densidades sobre la infección causada por el VNNV. Los datos muestran un inicio más temprano y unos porcentajes de mortalidad acumulada más altos, así como una mayor replicación del VNNV, conforme se incrementa la densidad de cultivo en los peces infectados. Sin embargo, el análisis de 3 genes biomarcadores de estrés (*hsp*70, *gr*1 y *pepck*) sugiere que las condiciones de cultivo ensayadas en este estudio no suponen una situación de estrés para los lenguados.

En el capítulo V, "*Transmisión del VNNV entre lenguados y doradas, y efecto del estrés en la infección*" se analiza la transmisión horizontal del VNNV entre estas dos especies, con las que ya se han hecho ensayos de policultivo. Los resultados confirman la transmisión del agente viral desde individuos infectados pertenecientes a una especie, hacia los peces sanos de la otra. También se observó una mayor replicación viral y elevados valores de mortalidad acumulada en el lenguado, presumiblemente debido al estrés derivado de la agresividad de la dorada, aspecto que se confirma por el análisis de expresión del gen *hsp*70, que muestra un notable incremento en los ejemplares de lenguado al inicio de la cohabitación. Por tanto, este trabajo evidencia el riesgo de la transmisión interespecífica del VNNV en condiciones de policultivo y el efecto del estrés en el desarrollo de la infección cuando se co-cultivan especies que poseen diferentes patrones comportamentales, lo que supone una limitación muy importante para la implementación de esta estrategia en especies susceptibles al virus.

En el último capítulo, denominado "V*iabilidad del VNNV en agua de mar: modulación por la temperatura y la salinidad*", se estudia el comportamiento de tres cepas de VNNV (con genotipos RGNNV, SJNNV y

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

RGNNV/SJNNV) en agua de mar, considerando diferentes parámetros que afectan a su viabilidad como la salinidad, la temperatura, o la exposición a luz solar, entre otros. Los resultados indican que la mayor viabilidad de las 3 cepas se produce a 15 ºC, detectándose partículas infectivas durante 2-4 meses, dependiendo del genotipo y que el incremento de temperatura reduce el número de partículas virales infectivas, aunque el genotipo RGNNV es el menos afectado. También se determinó que la exposición conjunta del VNNV a la luz UV y al oxígeno en las condiciones de acuario, aceleran la inactivación del virus. Por tanto, este capítulo destaca el gran potencial de propagación del VNNV en el medio acuático durante largos períodos de tiempo antes de que se produzca el incremento de las temperaturas asociado a la aparición de brotes de la enfermedad en el área mediterránea.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

SUMMARY

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

SUMMARY

Nervous Necrosis Virus (NNV) is an important worldwide aquatic pathogen, that belongs to the genus *Betanodavirus* (F. *Nodaviridae*). The viral genome is composed of two single-stranded, positive-sense RNA molecules, namely RNA1 (3.1 kb) and RNA2 (1.4 kb), which contain the ORF of the RNA dependent RNA polymerase (RdRp) and the capsid protein, respectively. During the infectious process, a third subgenomic RNA molecule, namely RNA3, is synthesized from the RNA1 template strand. RNA3 contains the ORF of two non-structural proteins, known as B1 and B2, whose functions facilitate viral replication through cell cycle arrest and the inhibition of apoptosis.

Betanodaviruses hold a hypervariable region in RNA2, namely T4, from which the 4 genotypes are differentiated: BFNNV (Barfin Flounder Nervous Necrosis Virus), RGNNV (Redspotted Grouper Nervous Necrosis Virus), SJNNV (Striped Jack Nervous Necrosis Virus) and TPNNV (Tiger Puffer Nervous Necrosis Virus). Natural reassortment between genomic segments of the RGNNV and SJNNNV genotypes in both combinations (RGNNV/SJNNNV and SJNNNV/RGNNV) has also been described. BFNNV strains are mainly distributed in cold water species of the North Atlantic (Europe and USA) while RGNNV strains cause epizootics mainly in temperate or warm waters; the SJNNNV type was initially located in East Asia, although it has also been described in Southern Europe, and finally the TPNNV genotype was described only once in Japanese waters. As for the reassortants, several strains with this genomic combination, mostly the RGNNV/SJNNNV type, have been described in the last 15 years in southern European waters and especially in the Mediterranean region.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

The NNV is the etiological agent of a neuropathology known as Viral Encephalopathy and Retinopathy (VER) or Viral Nervous Necrosis (VNN), which causes vacuolization and necrosis in host nerve cells of the central nervous system, retina, or spinal cord. It affects a wide range of fish species and is particularly severe during early developmental stages. It is mainly associated with marine fish, although it has also been detected in freshwater fish and invertebrates. The most common transmission route of NNV is horizontal spreading through the water column from infected to healthy individuals, although it can also be transmitted vertically to progeny.

Despite the severity of VER, to date, no effective prophylactic methods have been described to mitigate the effects of the virus or to prevent its entry into the rearing areas of aquaculture facilities. Therefore, this doctoral thesis entitled "**Epidemiology and control of infections caused by Betanodavirus**" was conceived with the aim to investigate possible pathogen entry routes into the facilities and to analyse the factors involved in the occurrence of disease outbreaks, in order to design effective control measures. It consists of 6 chapters, the results of which have been published in high impact journals, except for the first, which is in preparation.

Chapter I "*Epidemiological study of the prevalence of NNV in natural fish schools in the Atlantic Ocean*" deals with a virological analysis of fish caught along the Galician coast. NNV was detected in 1.72 % of the individuals analyzed, including species in which it had not yet been found. The only NNV genotypes detected were SJNNV and the reassortant RGNNV/SJNNNV, almost in the same proportion and, in addition, 4 RGNNV/SJNNNV isolates were obtained from pilchard and mackerel. These isolates hold several changes with respect to the parental genotypes and other reassortant isolates from sole and sea bream in the amino acid sequence of both the polymerase and the capsid protein, located in regions responsible for adaptation to temperature, the formation of the replication complex or interaction with host cells, which could explain the different replication kinetics observed in the experimental infections in sole.

The following two chapters assess NNV transmission by the oral route, through two marine invertebrates (rotifers and *Artemia*) that are commonly

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

used as food for marine fish larvae. Chapter II, "*Role of zooplankton in the transmission of VNNV: infection of sea bass larvae by rotifers*" shows the results of infecting 12-day post-hatching (dph) sea bass larvae using a culture of virus-carrying rotifers as the first food. First of all, it is shown that the NNV remains viable inside the rotifers for 48 hours, which supports the role of these invertebrates as NNV vectors. In addition, larvae fed with a single dose of rotifers carrying NNV show signs of VER and similar levels of mortality to those infected by bath. Likewise, similar levels of viral replication are reached in both infection routes, although a delay in the infection course is observed in the oral route. Chapter III "*Role of zooplankton in the transmission of VNNV: infection of sole larvae by Artemia*" demonstrates the potential of the crustacean *Artemia salina*, used as a second food in larval culture, to transmit NNV to 30 dph sole larvae. As in the previous chapter, it is shown that the NNV remains viable inside these crustaceans, although in this case for a longer period, up to 8 days, and that sole larvae fed with a culture of *Artemia* carrying NNV develop VER signs and mortality rates equivalent to those of the bath infection. On the other hand, experimental data suggest that the microalgae commonly used for zooplankton enrichment, such as *Isochrysis galbana* or *Nannochloropsis gaditana*, produce and release into the aquatic environment some substance/s that significantly affect NNV viability. Therefore, the results obtained in both chapters highlight the importance of establishing strict routine controls on live feed used in aquaculture hatcheries to prevent NNV introduction into the facilities.

The following chapters provide new approaches to VER outbreaks in aquaculture facilities. In recent years, due to the need to increase fish production, there has been an increase in the ratio of fish, and new techniques such as cohabitation of different species in the same space have been assayed. In Chapter IV "*Effect of culture density on VNNV infection in sole*" the effects of high-density culture on NNV infection are presented. The data show earlier onsets and higher cumulative mortality rates, as well as an increased NNV replication, as rearing density increases in infected fish. However, an analysis of 3 stress biomarker genes (*hsp*70, *gr*1 and *pepck*) suggests that the culture conditions tested in this study do not pose a stressful situation for sole.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

In Chapter V, " *NNV transmission of between sole and gilthead seabream and the effect of stress on infection*", NNV horizontal transmission is analyzed between these two species, in which polyculture trials have already been carried out. The results confirm the transmission of the viral agent from infected individuals belonging to one species to healthy fish of the other. A higher viral replication and high cumulative mortality values were also observed in the sole, presumably due to the stress derived from the aggressiveness of the sea bream, an aspect that is confirmed by the analysis of *hsp*70 gene expression, which shows a notable increase in the sole individuals at the beginning of the cohabitation. Therefore, this work confirms the risk of NNV interspecies transmission under polyculture conditions and the effect of stress on infection development when species with different behavioral patterns are co-cultured, which is a very important limitation for the implementation of this strategy in species susceptible to the virus.

In the last chapter, entitled " *NNV viability in seawater: modulation by temperature and salinity*", the behavior of three NNV strains (RGNNV, SJNNNV, and RGNNV/SJNNNV genotypes) is studied in seawater considering different parameters that affect their viability, such as salinity, temperature, or sunlight exposure, among others. The results indicate that the highest viability of the 3 strains occurs at 15 ºC, detecting infective particles for 2-4 months, depending on the genotype, and that the increase in temperature reduces the number of infective viral particles, although the RGNNV genotype is the least affected. It was also determined that joint exposure of NNV to UV light and oxygen in aquarium conditions accelerates virus inactivation. Therefore, this chapter highlights the great potential for NNV spreading in the aquatic environment for long periods of time before the rise in temperatures associated with the occurrence of disease outbreaks in the Mediterranean area.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

INTRODUCCIÓN

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

INTRODUCCIÓN

I. ESTADO MUNDIAL DE LA ACUICULTURA

Desde mediados del siglo pasado, la población mundial ha aumentado a un ritmo vertiginoso, alcanzando en el año 2021 la cifra de 7900 millones de personas. Esta tasa de crecimiento poblacional ha disparado un 3,2 % la demanda de proteína de pescado. Para cumplir con dicha demanda y satisfacer las necesidades de la población, la pesca extractiva aumentó notablemente las capturas, lo que ha conllevado la sobreexplotación de hasta un tercio de los bancos pesqueros marinos (FAO, 2018). La mayor parte de las capturas incluyen pequeños herbívoros pertenecientes a niveles inferiores en la cadena trófica, por lo que la presión sobre estos ecosistemas deriva en consecuencias directas y muy severas para los siguientes eslabones (Beal y col., 2018). Este declive de los bancos naturales de peces junto con la globalización ha favorecido la consolidación de la industria de la acuicultura como una de las alternativas viables a la pesca tradicional, permitiendo cumplir con la creciente demanda de proteína de pescado y manteniendo la sostenibilidad de los ecosistemas (Naylor y col., 2021).

En palabras de la FAO, la acuicultura se define como el conjunto de actividades y técnicas empleadas por el ser humano para la cría de organismos acuáticos, incluyendo peces, moluscos, crustáceos y algas, tanto en aguas continentales como oceánicas. Los países asiáticos, especialmente China, se constituyen como los principales productores con sistemas de producción más diversificados frente a otras regiones y con el mayor volumen de especies cultivadas. Tras los países asiáticos se encuentran, Chile, Noruega y Egipto, mientras que España ocupa el puesto 22º en el ranking de países productores de acuicultura (FAO, 2020; Naylor y col., 2021).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

En términos de producción, la acuicultura alcanzó la cifra récord de 114,5 millones de toneladas (mt) en el año 2018. De ellos, casi la mitad de la producción se corresponde con peces (54 mt), seguido de algas marinas (32 mt), moluscos, principalmente bivalvos (18 mt), y crustáceos (10 mt) (**Fig. 1**) (FAO, 2020; Naylor y col., 2021). La producción de acuicultura en el área mediterránea está dominada por especies como la dorada (*Sparus aurata*), la lubina (*Dicentrarchus labrax*) y la corvina (*Argyrosomus regius*), y en menor medida, el lenguado (*Solea senegalensis* y *S. solea*), el medregal (*Seriola dumerili*) o el pargo (*Pagrus pagrus*) (FEAP, 2020).

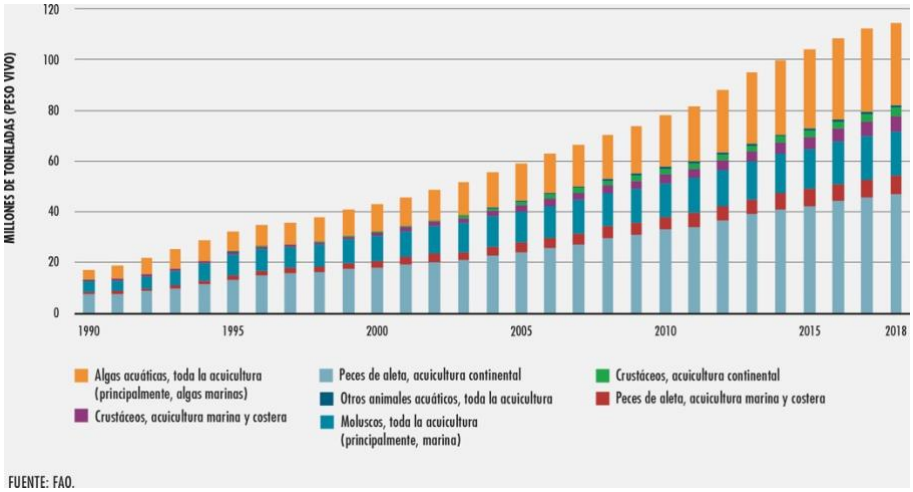


Figura 1. Producción acuícola mundial de animales acuáticos y algas entre 1990-2018. (FAO, 2020).

El rápido crecimiento de la piscicultura ha llevado parejo un incremento en la cantidad de alimento necesario, haciendo insostenible la utilización de las harinas y aceites de pescado. Las alternativas más adecuadas se han obtenido de plantas como la soja o el maíz, y de productos derivados de animales terrestres, como la harina de plumas, de carne o de huesos, ya que permiten satisfacer los requisitos nutricionales de los peces (Colgrave y col., 2021). Sin embargo, para la alimentación de los estados larvarios de peces y crustáceos se utiliza alimento vivo, compuesto por invertebrados que forman parte del zooplancton como los rotíferos o la *Artemia* sp, ya que, actualmente, ningún alimento artificial contiene una composición bioquímica que se adecúe

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

a sus requerimientos nutricionales. El uso de zooplancton como alimento permite un buen desarrollo de los peces, tanto a nivel de crecimiento, como de resistencia a enfermedades y supervivencia (Samat y col., 2020).

Desafortunadamente, los cultivos piscícolas también están sometidos a serias amenazas, como la aparición de epizootias, que pueden comprometer la producción. En las instalaciones se han definido ciertos puntos de control para evitar la entrada de patógenos, incluyendo los individuos portadores asintomáticos, el alimento o los fómites. Además, las características y el tipo de cultivo o los cambios en las temperaturas también son factores condicionantes y decisivos en la aparición y severidad de una epizootia (Zrncic y col., 2022).

La lista de los patógenos que suponen una amenaza para los cultivos de peces incluye, entre otros, bacterias de los géneros *Aeromonas*, *Photobacterium*, *Tenacibaculum* o *Vibrio*, el hongo *Saprolegnia*, el protozoo ciliado *Philasterides dicentrarchi*, o las amebas. Los virus asociados con problemas patológicos en peces se recogen en la **Tabla 1.**

Tabla 1. Relación de virus identificados en peces, según el Comité Internacional para la clasificación de los Virus (ICTV; *International Code of Virus Classification*).

Tipo y familia	Ejemplos
Virus de ARN	
Arenaviridae	*Wenling frogfish arenavirus* 1 (WIFV-1)
Birnaviridae	Virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa (IPNV)
Bornaviridae	*Wuhan sharpbelly bornavirus* (WhSBV)
Caliciviridae	*Fathead Minnow Calicivirus* (FMCV)
	Calicivirus del Salmón Atlántico (ASCV)
Filoviridae	*Xilang striavirus* (XILV)
Hepeviridae	*Cutthroat trout virus* (CTV)
Nodaviridae	Virus de la Necrosis Nerviosa Viral (VNNV)
Orthomyxoviridae	Virus de la Anemia Infecciosa del Salmón (ISAV)
	Virus de la Tilapia de Lago (TiLV)
Paramyxoviridae	Paramyxovirus del Salmón Atlántico (ASPV)
Picornaviridae	*Bluegill Picornavirus* (BGPV)
Totiviridae	*Piscine myocarditis virus* (PMCV)
Reoviridae	*Golden Shiner Virus* (GSV)
	Piscine orthoreovirus (PRV)
Retroviridae	Retrovirus del Sarcoma Dérmico del Walleye
	Retrovirus de la Hiperplasia Dérmica del Walleye
Rhabdoviridae	Virus de la Necrosis Hematopoyética Infecciosa (IHNV)
	Virus de la Septicemia Hemorrágica Viral (VHSV)

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tipo y familia	Ejemplos
	Virus de la Viremia Primaveral de la Carpa (SVCV)
Togaviridae	Alfavirus de salmónidos 1 (SAV-1) / Virus de la Enfermedad Pancreática del Salmón (SPDV)
	Alfavirus de salmónidos 2 (SAV-2) / *Sleeping Disease Virus* (SDV)
	Norwegian Samonid Alfavirus (NSAV / SAV-3)
Virus de ADN	
Alloherpesviridae	Herpesvirus de la carpa Koi (KHV o CyHV-3))
	Chanel catfish herpesvirus (CCV)
	*Anguillid herpesviru*s (AngHV-1)
Circoviridae	*Barbel circovirus*
Iridoviridae	Virus de la enfermedad del Linfocistis (LCDV)
	Virus de la Necrosis Infecciosa de Bazo y Riñón (ISKNV)
	Virus de la Necrosis Hematopoyética Epizoótica (EHNV)
	Red sea bream iridovirus (RSIV)
Adenoviridae	Adenovirus del bacalao del Atlántico
Papillomaviridae	*Nunpapillomavirus siluri*
	Silurus glanis papillomavirus 1 (SgPV1)
Polyomaviridae	*Black sea bass-associated polyomavirus 1* (BassPyV1)
	Sparus aurata polyomavirus (SaurPyV1)
Poxviridae	*Carp edema virus* (CEV)

Algunos de los virus mencionados en la tabla anterior se encuentran en la lista de enfermedades de animales acuáticos de declaración obligatoria en la Unión Europea (Reglamento de ejecución 2020/2002) y de aplicación en territorio español (RD 526/2014), como el virus de la necrosis hematopoyética epizoótica (EHNV), el virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (IHNV), el virus de la anemia infecciosa del salmón (ISAV), el herpesvirus del pez koi (KHV) o el virus de la septicemia hemorrágica viral (VHSV). Sin embargo, esta lista no recoge el Virus de la Necrosis Nerviosa Viral (VNNV), perteneciente a la F. *Nodaviridae* que, debido a su elevada incidencia en la piscicultura mediterránea será objeto de estudio en esta tesis doctoral.

II. FAMILIA *NODAVIRIDAE* – VIRUS DE LA NECROSIS NERVIOSA VIRAL (VNNV)

La familia *Nodaviridae* engloba un grupo de agentes virales aislados por primera vez en insectos, y con capacidad de infectar tanto vertebrados como

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

invertebrados (Bailey y col., 1975). El nombre proviene de la ciudad de Nodamura (Japón) donde se produjo el primer aislamiento a partir del mosquito *Culex tritaeniorhynchus* (Hameed y col., 2019). Dentro de la familia *Nodaviridae* se distinguen los géneros *Alfanodavirus* y *Betanodavirus*, en el que se encuentra el virus de la Necrosis Nerviosa Viral (VNNV). Este virus es responsable de una patología que afecta de forma severa a la piscicultura, fundamentalmente marina, a nivel mundial desde finales del siglo XX.

II.1. Contexto histórico

La primera descripción de la enfermedad, conocida con posterioridad como necrosis nerviosa viral (NNV) o encefalopatía y retinopatía viral (ERV), se produjo en alevines de perca gigante (*Lates calcarifer*) que presentaban un comportamiento natatorio anormal acompañado de anorexia, cierto grado de vacuolización del cerebro y nervios periféricos e hinchazón de la médula espinal (Glazebrook y Campbell, 1987). Poco después, se notificó un 100 % de mortalidad en una población de perca loro japonesa (*Oplegnathus fasciatus*) (Yoshikoshi e Inoue, 1990). Al inicio de la patología, localizada en los meses de junio y julio con temperaturas elevadas del agua, los individuos mostraban natación anormal asociada a pérdidas de equilibrio, y un oscurecimiento en la coloración. A nivel histológico, se observaba vacuolización y necrosis de los tejidos nerviosos, incluyendo médula espinal, ganglios y cerebro, más evidente en los peces infectados en estados larvarios y juveniles que en fases posteriores. El resto de los órganos examinados, como branquias, corazón, hígado, riñón o bazo, no mostraron lesiones. Estos autores también describieron la presencia de unas partículas virales de un tamaño aproximado de 34 nm y carentes de envuelta en el citoplasma de las neuronas y en el espacio extracelular.

En los inicios de la década de los 90 se realizaron numerosas descripciones de una neuropatología que afectaba a diferentes especies de peces en diversas localizaciones geográficas y causando altos niveles de mortalidad: en larvas de perca gigante en Australia (Glazebrook y col., 1990; Munday y col., 1992) y Haití (Renault y col., 1991), en larvas y juveniles de lubina en la costa francesa (Breuil y col., 1991), en alevines de mero carcelario (*Epinephelus septemfasciatus*) en Corea (Gyu y col., 1991), y en larvas de rodaballo (*Scophtalmus maximus*) cultivado en Noruega (Bloch y col., 1991).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

En el año 1992, autores japoneses notificaron la detección de partículas virales en el interior del citoplasma de las células neuronales de jurel dentón (*striped Jack* en inglés; *Pseudocaranx dentex*), que sufrían necrosis nerviosa, por lo que denominaron a este virus como *Striped Jack Nervous Necrosis Virus* (SJNNV) (Mori y col., 1992).

Sin embargo, no fue hasta el año 1996 cuando Frerichs y colaboradores consiguieron aislar el agente viral en cultivo celular, a partir de juveniles de lubina con sintomatología similar a la reportada en los estudios mencionados anteriormente.

II.2. Características del VNNV

El VNNV es un virus desnudo, de simetría icosaédrica y tamaño aproximado de 25-30 nm (Mori y col., 1992). La cápside posee un número de triangulación de valor 3, y está formada por 180 subunidades proteicas (Chen y col., 2015c; Tang y col., 2002; Thiéry y col., 2011). Los viriones poseen una densidad de flotación en gradiente de CsCl de 1,30 g/cm^3 (Breuil y col., 1991).

El genoma viral está formado por dos moléculas de ARN monocatenal o de cadena sencilla y sentido positivo (+ssARN, del inglés *single stranded RNA*), denominadas ARN1 y ARN2, que carecen de una cola de poli-adeninas (Poli-A) en el extremo 3', en contraposición a lo observado en otros virus (Comps y col., 1996; Mori y col., 1992).

La molécula de ARN1 del VNNV tiene un tamaño de 3100 – 3112 nucleótidos. Entre las bases 79 y 3030 de la cepa tipo del VNNV (SJNNV) se encuentra la pauta de lectura abierta (*open reading frame*; ORF) codificante de una proteína de 110 kDa de tamaño. Este polipéptido, conocido como ARN polimerasa ARN dependiente (RdRp) o proteína A es responsable de la replicación viral (Ahlquist, 2002; Chen y col., 2015c; Costa y Thompson, 2016; Hegde y col., 2002; Nagai y Nishizawa, 1999; Sommerset y Nerland, 2004; Tan y col., 2001). Además, muestra cierta sensibilidad a la temperatura (Hata y col., 2010; Panzarin y col., 2014) y una elevada tasa de evolución (Panzarin y col., 2012).

La molécula de ARN2 tiene un tamaño de 1421 – 1434 nucleótidos, y un ORF desde la posición 17 a la 1039 en la cepa tipo, que codifica la proteína

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

estructural de la cápside (Cp) (Chen y col., 2015c; Delsert y col, 1997; Hegde y col., 2002; Nishizawa y col., 1995; Tan y col., 2001). La región N-terminal podría estar implicada en la unión o reconocimiento del genoma viral (Fisher y Johnson, 1993), tal y como se ha observado en los alfanodavirus (Marshall y Schneemann, 2001), mientras que la región C-terminal contiene una secuencia responsable de la especificidad de huésped (Ito y col., 2008; Iwamoto y col., 2004).

Durante la fase de replicación, la RdRp dirige la producción de la molécula de ARN3 o ARN subgenómico a partir del ARN1 (Johnson y col., 2003). Esta molécula de ARN está formada por 371 nucleótidos localizados entre las posiciones 2730-3100 del ARN1 (Iwamoto y col., 2005; Sommerset y Nerland, 2004), y contiene dos ORF codificantes de dos proteínas no estructurales, denominadas B1 y B2. El ORF de la proteína B1, formada por 111 aminoácidos, se corresponde con el extremo C-terminal de la proteína A, mientras que en la proteína B2, de 75 aminoácidos (Liu y col., 2012; Tan y col., 2001), el ORF se localiza en la posición +1 del ORF de la proteína B1 (Costa y Thompson, 2016).

II.3. Clasificaciones del VNNV

Los primeros estudios clasificaron al VNNV en la Familia *Picornaviridae* en base a sus características morfológicas y bioquímicas (Bloch y col., 1991; Boonyaratpalin y col., 1996; Breuil y col., 1991; Glazebrook y col., 1990; Munday y col., 1992).

En el año 1992, en base a las características del virus, Mori y colaboradores sugirieron la inclusión de estos virus dentro de la Familia *Nodaviridae*. Posteriormente, debido al amplio espectro de especies susceptibles y al tipo de patología producida, algunos autores propusieron, aunque sin éxito, incluirlo en un grupo denominado Nodavirus de la Neuropatía Piscícola (PNN, del inglés *Piscine Neuropathy Nodavirus*) o Virus de la Encefalitis de Peces (FEV, del inglés *fish encephalitis virus*) (Comps y col., 1996; Frerichs y col., 1996). Sin embargo, dado que la identidad con los nodavirus de insectos descritos hasta el momento era inferior al 30 % y a que se detectó una secuencia conservada en el ARN2 ausente en los nodavirus de insectos (Nishizawa y col., 1995), se propuso la creación de un nuevo género

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

dentro de la F. *Nodaviridae*. Así, tal y como se recoge en la 7ª edición de la clasificación del Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV), la Familia *Nodaviridae* se diferenció en los géneros *Alfanodavirus* y *Betanodavirus* (Ball y col., 2000).

El género *Alfanodavirus* se compone de los aislados obtenidos a partir de insectos, y que se clasifican en 5 especies: *Virus Nodamura* (NoV), *Virus Black Beetle* (BBV), *Virus Boolarra* (BoV), *Virus Flock House* (FHV) y V*irus Pariacoto* (Hameed y col., 2019; Thiery y col., 2011). La especie NoV, además de afectar a insectos también puede provocar parálisis y muerte en ratón y hámster, mientras que el Virus Pariacoto ha sido detectado también en vertebrados (Johnson y col., 2003).

La clasificación dentro del género *Betanodavirus*, que incluye los virus que afectan a peces, se describe en el apartado siguiente.

II.3.1. Clasificación filogenética del género *Betanodavirus*

Al igual que los alfanodavirus, el género *Betanodavirus* se divide en diferentes especies o genotipos. Actualmente el ICTV reconoce 4, que se denominan con el nombre de la especie de la que fueron aislados por primera vez: BFNNV (Ba*rfin Flounder Nervous Necrosis Virus*), RGNNV (*Redspotted Grouper Nervous Necrosis Virus*), SJNNV (*Striped Jack Nervous Necrosis Nirus*), y TPNNV (*Tiger Puffer Nervous Necrosis Virus*) (Nishizawa y col., 1995, 1997). La diferencia entre estos 4 genotipos se encuentra en una región muy heterogénea del ARN2, denominada T4 y formada por 420 nucleótidos. Sin embargo, los análisis filogenéticos realizados sobre los dos segmentos genómicos permitieron descubrir que algunas cepas tendrían una clasificación distinta a la otorgada por el estudio del ARN2. Así, Toffolo y col. (2007) demostraron la recombinación de segmentos genómicos del VNNV en poblaciones naturales de peces, aunque previamente, Iwamoto y col. (2004) habían sugerido esta posibilidad mediante el diseño *in vitro* de quimeras de VNNV formadas por ARN de los genotipos RGNNV y SJNNV. Esta estrategia evolutiva se produce únicamente en los virus segmentados de ARN, debido a la estructura de su genoma y a que proporciona ciertas ventajas, como una mayor variabilidad que propicia la evasión del sistema inmune del huésped, entre otras (He y Teng, 2015; Vijaykrishna y col., 2015).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Algunos de los genotipos nombrados anteriormente están formados por varios subgrupos. Así, el genotipo BFNNV incluye 3 clados denominados *Atlantic Halibut Nervous Necrosis Virus* (AHNNV), *Atlantic Cod Nervous Necrosis Virus* (ACNNV), y *Gadus Morhua Nervous Necrosis Virus* (GMNNV) (Nylund y col., 2008). Inicialmente, el grupo ACNNV, detectado en Canadá en bacalao del atlántico (*Gadus morhua*) y en solla roja (*Pseudopleuronectes americanus*) con sintomatología de NNV fue considerado el quinto genotipo dentro de los *Betanodavirus* (Gagné y col., 2004). Sin embargo, estudios posteriores desecharon esta idea y clasifican al ACNNV dentro del genotipo BFNNV (Binesh y Greeshma, 2013; Moody y col., 2009; Nylund y col., 2008). En cuanto al grupo RGNNV, Thiéry y col. (2004) diferenciaron dos clústeres (Ia y Ib), aunque únicamente analizaron aislados franceses, mientras que un análisis más completo utilizando cepas de orígenes diversos distinguió hasta 7 subgrupos (He y Teng, 2015). Además, este genotipo también incluye los virus OSGNNV (aislado de Or*ange-spotted grouper*), DGNNV (*Dragon grouper*), y MGNNV (*Malabaricus grouper*), que muestran un 99 % de identidad con las cepas tipo RGNNV, si bien se han clasificado como potenciales especies diferentes (Chi y col., 2001), aunque no aceptadas por el ICTV.

En la literatura se cita con frecuencia un quinto genotipo, el *Turbot Nervous Necrosis Virus* (TNNV), detectado en larvas de rodaballo, pero que no se ha podido aislar en cultivo celular (Johansen y col., 2004) y que tampoco está reconocido oficialmente. El análisis filogenético de la proteína de la cápside reveló que este virus forma un clado hermano a los otros 4 (Cutrín y col., 2007; Moody y col., 2009).

Recientemente, se aislaron diversas cepas de VNNV a partir de moluscos en aguas de Corea, denominados *Korean Shellfish Nervous Necrosis Virus* (KSNNV). Estas cepas presentan una homología baja con respecto a los 4 genotipos del género *Betanodavirus*, por lo que se considera un grupo hermano al TNNV (Kim y col., 2019) aunque, de momento, no hay datos suficientes que apoyen su inclusión como un nuevo genotipo dentro de los *Betanodavirus*. Además, también se han detectado cepas recombinantes entre KSNNV y RGNNV en ambas formas KSNNV/ RGNNV o RGNNV/KSNNV (Kim y col., 2021a,b).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Los nodavirus también han sido aislados de crustáceos como el langostino de Malasia (*Macrobranchium rosembergii*) y el langostino patiblanco (*Penaeus vannamei*), como agentes etiológicos de la enfermedad de la cola blanca (WTD, del inglés *White Tail Disease*). Estos aislados se denominaron MrNV y PvNV, respectivamente y muestran unos bajos porcentajes de homología con respecto al resto de los nodavirus, por lo que Naveen Kumar y col. (2013) han propuesto la creación de un nuevo género denominado *Gammanodavirus* para incluirlos. Además de las diferencias en la secuencia genómica, presentan otras diferencias con el resto de los nodavirus, como utilizar 6 iones de calcio en lugar de uno para la estabilización de la proteína de la cápside. Los estudios realizados hasta el momento indican que los nodavirus de crustáceos presentan unas características más similares a los virus de plantas del género *Tombusvirus*, que a los demás nodavirus (Ho y col., 2018).

II.3.2. Otras clasificaciones

Thiery y col. (2004) propusieron clasificar los betanodavirus en función del origen geográfico de las cepas, utilizando también la región T4 del ARN2. Así, diferencian 4 grupos: el clado I incluye las cepas RGNNV aisladas en aguas cálidas (generalmente temperaturas superiores a 25 ºC) y se subdivide en dos subgrupos Ia y Ib. El grupo II (con 3 subgrupos) incluye únicamente aislados de aguas frías y pertenecientes al genotipo BFNNV, el grupo III está formado por el aislado TPNNV, mientras que el grupo IV lo forman los aislados de jurel dentón, que se corresponden con el genotipo SJNNV. Aunque algunos autores utilizaron esta clasificación (Moody y col., 2009; Olveira y col., 2009; Panzarin y col., 2012), la más ampliamente utilizada es la de Nishizawa y col. (1997).

Los betanodavirus también se pueden clasificar atendiendo a sus propiedades serológicas. Mori y col. (2003) establecieron la distribución de los 4 genotipos en 3 categorías serológicas, en las que los serotipos A y B incluyen los genotipos SJNNV y TPNNV, respectivamente, y los dos genotipos restantes, RGNNV y BFNNV, conforman el serotipo C. Sin embargo, esta clasificación incluía principalmente aislados asiáticos, por lo

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

que, en un análisis posterior considerando también cepas europeas, se incluyó el genotipo BFNNV dentro del serogrupo B (Panzarin y col., 2016).

II.4. Epidemiología

La aparición de los betanodavirus en la naturaleza, se estima que pudo ocurrir en el siglo XIV y, desde ese momento, han evolucionado con una tasa aproximada de 3,6 x 10^{-4} sustituciones/sitio/año. El evento de divergencia por el cual evolucionó cada genotipo se produjo de forma distinta en cada segmento. Así, en base a la proteína RdRp, el primer genotipo que se diferenció del resto fue el RGNNV, seguido por el SJNNV, y posteriormente, TPNNV y BFNNV. En el caso de la proteína de la cápside, el ancestro de los genotipos RGNNV y BFNNV se separó del ancestro del SJNNV y TPNNV, y a continuación, la división de cada uno de esos grupos ocurrió en un evento casi simultáneo. En cuanto al evento de aparición de los genotipos recombinantes, podría haber tenido lugar en la década de los años 80 del siglo pasado (He y Teng, 2015).

II.4.1. Vertebrados del medio marino

Los betanodavirus, con una distribución casi mundial (Bandín y Souto, 2020), son responsables de numerosos episodios patológicos en especies cultivadas y salvajes del medio marino, especialmente en Asia, aunque también en Europa, Oceanía y América. Sin embargo, hasta el momento no se ha reportado ningún caso en Sudamérica. Estos episodios afectan a 183 especies de peces, distribuidas en 68 familias y 21 órdenes. La mayor parte fueron desencadenados por el genotipo RGNNV (75 %), seguido del BFNNV (5 %) y en menor medida el recombinante RG/SJ y el SJNNV (2 %), mientras que el recombinante SJ/RG y el TPNNV representan únicamente el 1% de las detecciones. Además, en un 15 % de los casos no se ofrecen datos del genotipo (Bandín y Souto, 2020) (**Tabla 2**).

El genotipo BFNNV está formado por betanodavirus aislados a partir de especies de aguas frías cultivadas en Noruega (Grotmol y col., 2000), Reino Unido (Starkey y col., 2000, 2001), Canadá (Barker y col., 2002), Estados Unidos (Gagné y col., 2004), y Japón (Nishizawa y col., 1997). Dentro de este genotipo, el clado AHNNV incluye cepas aisladas de fletán (*Hippoglossus hipoglossus*), "*barfin flounder"* (*Verasper moseri*), lenguado común (*Solea*

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

vulgaris), bacalao (*Gadus morhua*) y lubina (*Dicentrarchus labrax*); el clado ACNNV contiene aislados de bacalao, eglefino (*Melanogramus aeglefinus*) y solla roja, y, por último, el clado GMNNV está compuesto por aislados de bacalao y tabernero (*Ctenolabrus rupestris*) (Korsnes y col., 2017; Nylund y col., 2008).

El genotipo que presenta una mayor distribución es el RGNNV. Se localiza en aguas tropicales y templadas, como la cuenca mediterránea, y aguas costeras de EEUU, Asia o Australia, en un amplio rango de especies de diferentes estados de desarrollo, salvajes o en cultivo, sintomáticos o asintomáticos (Bandín y Souto, 2020). Entre las especies marinas afectadas en estos episodios se encuentran peces del orden *Centrarchiformes*, como las especies *Oplegnathus punctatus* en Japón y *Macquaria novemaculeata* en Australia, el múgil (*Mugil cephalus*, Orden *Mugiliformes*) en Israel, o la platija japonesa (*Paralichtycus olivaceus*; orden *Pleuronectiformes*) en Japón y Corea, aunque el orden en el que se han detectado el mayor número de especies afectadas es el O. *Perciformes*. En él se incluyen la perca gigante en Taiwán, India, Singapur, Malasia, Australia, Israel, China e Indonesia; la lubina en Martinica, Portugal, Italia, Francia, España y otras localizaciones en la región mediterránea; el verrugato (*Umbrina cirrosa*) en Francia, Italia y el mar Adriático, y numerosas especies de mero (*Ephinephelus aeneus, E. akaara, E. fuscogutatus, E. malabaricus, E. septemfasciatus*, etc) en Israel, Taiwán, Japón, China, Italia, Argelia o Malasia.

El genotipo SJNNV se consideró durante mucho tiempo exclusivo de aguas de Japón (Nishizawa y col., 1997) pero también se ha detectado en la península ibérica, en cultivos de lubina, dorada y lenguado senegalés (*Solea senegalensis*) (Cutrín y col., 2007), y en individuos asintomáticos de poblaciones naturales de corvina (Lopez-Jimena y col., 2010), lisa (*Chelon labrosus*) (Moreno y col., 2014), y anguila europea (*Anguilla anguilla*) (Bandín y col., 2014).

En cuanto al TPNNV, es el único genotipo formado por un solo aislado. Fue detectado en pez globo tigre (del inglés *tiger puffer, Takifugu rubripes*) en aguas de Japón en el año 1993 (Nakai y col., 1994) y no se han vuelto a aislar ni detectar cepas con este genotipo en ninguna otra ocasión.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Las infecciones causadas por recombinantes entre los genotipos RGNNV y SJNNV, como se ha citado anteriormente, se describieron por primera vez en el año 2007, en lubinas cultivadas en el mar Adriático en Croacia e Italia, aunque el brote epizoótico se había producido en el año 1996 (Toffolo y col., 2007). A continuación, Olveira y col. (2009), observaron que 7 aislados procedentes de epizootias en lenguado y dorada clasificados inicialmente como SJNNV (Cutrín y col., 2007), eran realmente recombinantes RG/SJ.

Tabla 2. Relación de especies de peces marinos salvajes y en cultivo en las que se ha aislado el VNNV.

Orden y Familia	Nombre específico	Nombre común	Genotipo	Lugar
Anguiliformes				
Anguillidae	*Anguilla anguilla*	Anguila europea	SJNNV	España[1]
Congridae	*Rhynchocymba nystromi*	Congrio	RGNNV	China[2]
Muraenidae	*Rhinomuraena quaesita*	Anguila listón azul	ND	Corea, Indonesia[3]
Atheriniformes				
Atherinidae	*Atherina hepsetus*	Chucleto	RGNNV	Grecia[4]
Aulopiformes				
Synodontide	*Saurida filamentosa*	Saurio "Threadfin"	RGNNV	China[2]
	S. lessepsianus	"*Brushtooth lizardfish*"	RGNNV	Mediterráneo[5]
	Trachinocephalus myops	Chile chato	RGNNV	China[2]
Bathrachoidiformes				
Bathrachoididae	*Halobatrachus didactylus*	Pez sapo	RGNNV	España[6]
Beloniformes				
Belonidae	*Belone belone*	Aguja	RGNNV	Italia[7]
Exocoetidae	*Cheilopogon heterurus*	Volador mediterráneo	RGNNV	Grecia[4]
Beryciformes				
Monocentrdiae	*Monocentris japonica*	Pez piña	ND	Corea, Japón[3]
Centrarchiformes				
Latridae	*Latris lineata*	Trompetista rayado	RGNNV	Australia[8,9]
Oplegnatidae	*Oplegnathus fasciatus*	Pez loro japonés	ND	Japón[10-12]
	O. punctatus	"*Spotted knifejaw*"	RGNNV	Japón[13,14]
	Macquaria novemaculeata	Lubina australiana	RGNNV	Australia[9]
Cupleiformes				
Cupleidae	*Sardina pilchardus*	Sardina común	RG, RG/SJ	Italia[4,7], Túnez[6]
	Sardinella aurita	Alacha	RGNNV	Mediterráneo[5,6]
	S. jussieui	"Sardine"	RGNNV	China[2]

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Orden y Familia	Nombre específico	Nombre común	Genotipo	Lugar
Dussumieriidae	*Dussumieria elopsoides*	Esbelta sardina arcoíris	RGNNV	Mediterráneo[5]
Engraulidae	*Engraulis japonicus*	Anchoa japonesa	RGNNV	Corea, Japón[3]
	Tolephorus commersonnii	Achoa de Commerson	RGNNV	China[2]
Gadiformes				
Gadidae	*Gadus morhua*	Bacalao del Atlántico	BFNNV	Canadá, EEUU, Noruega, Reino Unido[9,14-18]
	G. macrocephalus	Bacalao del Pacífico	BFNNV	Japón[19], China[20]
	Melanogrammus aelefinus	Eglefino	BFNNV	Canadá, EEUU[16]
	Merlangius merlangus	Merlán	RGNNV	Italia[7]
	Pollachius pollachius	Abadejo	ND	Noruega[17]
	P. virens	Carbonero	ND	Noruega[17]
	Trisopterus minutus	Faneca menor	RGNNV	Italia, Grecia
Macrouridae	*Hymenocephalus italicus*	Granadero	ND	Italia
Merluciidae	*Merluccius merluccius*	Merluza europea	RGNNV	Italia[7], Grecia[4]
Gonorynchiformes				
Chanidae	*Chanos chanos*	Sábalo	ND	India[3]
Heterodontiformes				
Heterodontidae	*Heterodontus japonicus*	Suño japonés	RGNNV	Japón[10]
Kurtiformes				
Apogonidae	*Apogon etythrinus*	"Red stoplight cardinalfish"	RGNNV	China[2]
Mugiliformes				
Mugilidae	*Chelon labrosus*	Muble/lisa	RG, SJ	España[6]
	Mugil cephalus	Pardete	RGNNV	Grecia[4,23], Israel[22], Italia[7], Japón[24], Mar Adriático[7]
	Liza auratus	Galupe	RGNNV	Irán[25], Túnez[6]
	L. saliens	Lisa	ND	Irán[25]
Notacanthiformes				
Notacanthidae	*Notacanthus bonaparte*	Anguila espinosa de Bonaparte	ND	Italia[26]
Perciformes				
Acanthuridae	*Zebrasoma falvescens*	Pez cirujano amarillo	ND	Corea, Singapur[3]
Carangidae	*Alectis indica*	Pámpano de pluma	RGNNV	China[24]
	Carangoides equula	Jurel aliblanco	RG, SJ	Japón[27]
	Caranx djedaba	Jurel subarí	RGNNV	China[24]
	Caranx oshimai	Jurel voraz	RGNNV	China[26]
	Decapterus maruadsi	Macarela japonesa	RGNNV	Japón[10]
	Pseudocaranx dentex	Jurel dentón	SJNNV	Japón[19]
	Selaroides leptolepis	Chicharro banda dorada	RGNN	China[2,24]
	Seriola dumerili	Seriola	ND	Japón[4,13,27]

Orden y Familia	Nombre específico	Nombre común	Genotipo	Lugar
	S. quinqueradiata	Medregal del Japón	SJNNV	Japón[27]
	Selene vomer	Jorobado de penacho	ND	Corea, Norte América[3]
	Trachinotus blochii	Pámpano lunero	RGNNV	Malasia[28]
	T. falcatus	Pámpano palometa	RGNNV	Taiwán[29,30]
	T. japonicus	Jurel japonés	RG, SJ	China[27], Japón[10]
	T. mediterraneus	Jurel mediterráneo	RG, RG/SJ	Grecia[4], Italia[7]
	T. ovatus	Palometa blanca	RGNNV	China[2,31-33]
	T. picturatus	Jurel azul	ND	Italia[34]
	T. trachurus	Jurel	RGNNV	Italia[4,7], Túnez[6]
Centrolophidae	*Psenopsis anomala*	Pámpano del Pacífico	RGNNV	China[2]
Centropomatidae	*Lates calcarifer*	Perca gigante	RGNNV	Taiwán[30], Singapur[39], Australia[39], China[2], India[35], Indonesia[36], Israel[22], Malasia[37]
	Lateolabrax japonicus	Lubina japonesa	ND	Japón[38]
Epigonidae	*Epigonus telescopus*	Pez del diablo	ND	Italia[26]
Ephippidae	*Platax orbicularis*	Pez murciélago circular	RGNNV	Polinesia Francesa[39]
Gobidae	*Gobius niger*	Chaparrudo	RGNNV	Italia[7]
Haemulidae	*Plectorhynchus pictus*	Burro trucha	RGNNV	China[24]
Kyphosidae	*Microcanthus strigatus*	"Stripey fish"	RGNNV	Japón[10]
Labridae	*Ctenolabrus rupestris*	Tabernero	BF	Noruega, Suecia[40]
	Labrus bergylta	Maragota	BF, RG	Suecia[40]
	Symphodus melops	Porredana	BF, RG	Noruega[40]
Lateolabracidae	*Lateolabrax sp*	Lubina sp	RGNNV	Japón[2]
	Lateolabrax japonicus	Lubina japonesa	RGNNV	China[2]
Leiognathidae	*Leigognathus berbis*	Motambo bérbero	RGNNV	China[24]
	L. elongatus	Motambo elegante	RGNNV	China[24]
	L. insidiator	Motambo boxeador	RGNNV	China[24]
Lutjanidae	*Lutjanus argentimaculatus*	Pargo de manglar	RGNNV	China[24]
	L. erythropterus	Pargo carmesí	RGNNV	Taiwán[29], Malasia[41]
	L. fulviflamma	Pargo tintero	RGNNV	China[24]
	L. johni	Pargo jaspeado	RGNNV	China[24]
	L. russelli	Pargo ojo de buey	RGNNV	China[24]
	L. sanguineus	Pargo cabezón	RGNNV	China[24]
Moronidae	*Dicentrarchus labrax*	Lubina europea	RGNNV, RG/SJ, SJ/RG	Martinica[42,43], Área mediterránea[14,22,23,34,44-47]
Mullidae	*Mullus barbatus barbatus*	Salmonete del fango	RGNNV	Italia, Mar Adriático[23]
	M. surmuletus	Salmonete de roca	RGNNV	Mediterráneo[4,5,21]
	Upeneus japonicus	Salmonete bensasi	RGNNV	China[2]
	U. moluccensis	Salmonete de banda dorada	RGNNV	Mediterráneo[5]

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Orden y Familia	Nombre específico	Nombre común	Genotipo	Lugar
Nemipteridae	*Nempiterus japonicus*	Besugo japonés	RGNNV	China[2]
	N. randalii	Besugo de Randall	RGNNV	Mediterráneo[5]
Percophidae	*Chrionema chlorotaenia*	"Ray finned fish"	RGNNV	China[2]
Polycentridae	*Monocirrhus polyacanthus*	Pez hoja Amazonas	RGNNV	Corea, Amazonas[3]
Pomacentridae	*Amphiprion sebae Bleeker*	Pez payaso rosa	RGNNV	India[35]
	Dascyllus trimaculatus	Damisela	RGNNV	Korea, Singapur[3]
	Pomacentrus coelestis	"Heavenly damselfish"	RGNNV	Japón[10]
Priancanthidae	*Priacanthus macracanthus*	"*Red bigeye*"	RGNNV	China[5]
Rachycentridae	*Rachycentron canadum*	Cobia	RGNNV	Taiwán[30]
Sciaenidae	*Argyrosomus argentatus*	Perca regia	RGNNV	China[48]
	A. macrocephalus	"*Big-head croaker*"	RGNNV	China[5]
	A. regius	Corvina	RG, SJ	España[48]
	Johnius belengerii	Corvina de Belanger	RGNNV	China[2]
	Sciaena umbra	Corvina	RGNNV	Italia[29], Grecia[4]
	Sciaenops ocellatus	Corvinón ocelado	RGNNV	Corea[24], Israel[30]
	Umbrina cirrosa	Verrugato	RGNNV	Francia[50], Italia[14,23], Mar Adriático[51,52]
	U. russelli	Lambe chivato	RGNNV	China[24]
	Atractoscion nobilis	Corvina blanca	RGNNV	California[53]
Scombridae	*Scomber japonicus*	Verdel	RG, SJ	Japón[27]
	S. scombrus	Caballa	-	Noruega[17], Grecia[4]
	Thunnus orientalis	Atún oriental de aleta azul	RGNNV	Japón[54]
	T. thynnus		RGNNV	Japón[55], Grecia[4]
Serranidae	*Epinephelus aeneus*	Mero blanco	RGNNV	Israel[22]
	E. akaara	Mero de pintas rojas	ND	Taiwán[56], Japón[57]
	E. areolatus	Mero areolado	RGNNV	Japón[55], Grecia[4]
	E. awooara	Mero amarillo	RGNNV	Taiwán[58], China[2]
	E. bleekeri	"Duskytail grouper"	RGNNV	China[24]
	E. chlorostigma	Mero pintado	ND	Golfo Arabia[59]
	E. coioides	Mero de pintas naranjas	RGNNV	Filipinas[60], Taiwán[30]
	E. epistictus	Mero pálido	RGNNV	China[24]
	E. fario	Mero espigón	RGNNV	China[24]
	E. fasciatomaculatus	Mero de las piedras	RGNNV	China[24]
	E. fuscoguttatus	Mero manchado	RGNNV	Taiwán[41], Malasia[36]
	E. lanceolatus	Mero lanceolado	RGNNV	China[2], Taiwán[63], Australia[64]
	E. malabaricus	Mero malabar	RGNNV	Taiwán[63]
	E. marginatus	Mero moreno	RGNNV	Italia[61], Argelia[62,65], España[61]
	E. megachir	Mero aleta larga	RGNNV	China[24]
	E. merra	Mero panal	RGNNV	China[24]

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Orden y Familia	Nombre específico	Nombre común	Genotipo	Lugar
	E. moara	Mero de diente largo	ND	Japón[66], China[24]
	E. septemfasciatus	Mero carcelario	ND	Japón[67], Corea[68]
	E. tauvina	Mero lutria	RGNNV	Singapur[69-71]
	E.fuscoguttatus x E. lanceolatus	Mero híbrido	RGNNV	China, Indonesia[72]
	Chromileptes altivelis	Mero jorobado	RGNNV	Taiwán[29,30], Indonesia[29,30], Malasia[73-75], Australia[9]
	Plectropomus maculatus	Mero con pintas	ND	Tailandia[76]
Siganidae	*Siganus fuscescens*	Pez conejo oscuro	RGNNV	China[2]
	S. oramin	Sigano pintado	RGNNV	China[24]
Sparidae	*Boop boops*	Boga	RGNNV	Italia[34], Grecia[4]
	D. annularis	Sargo	-	Italia[34]
	D. puntazzo	Sargo picudo	RGNNV	Grecia[4]
	D. vulgaris	Sargo	RGNNV	España[6]
	Lithognathus mormyrus	Herrera	RGNNV	Mediterráneo[5]
	Sparus aurata	Dorada	RG/SJ	Península Ibérica[5,44], Italia[5,23], Arabia[59,77-79], Grecia[4,23,44]
	Pagellus acarne	Chopa	RGNNV	España[6]
	Pagrus major	Pargo japonés	RGNNV	Japón, Korea[10,12]
	Pagrus pagrus	Besugo	RGNNV	España[80], Grecia[4]
	Sarpa sarpa	Salema	RGNNV	Grecia[4]
	Sparidentex hasta	Sargo sobaito	ND	Golfo de Arabia[59]
	Spicara smaris	Caramel	RGNNV	Grecia[4]
	S. maena	Chucla	RGNNV	Grecia[4]
	Spondyliosoma cantharus	Chopa	RGNNV	España[6]
Sphyraenidae	*Sphiraena shiraena*	Barracuda	RGNNV	Italia[34], Grecia[4]
	Diplodus sargus	Sargo	RGNNV	Italia, Adriático[23]
Stromateidae	*Pampus argenteus*	Palometa plateada	RGNNV	China[2]
Terapontidae	*Pelates quadrilineatus*	Baraonga aurora	RGNNV	China[2]
	Terapon jarbua	Baraonga jarbúa	RGNNV	China[2]
Zanclidae	*Zanclus cornutus*	Ídolo moro	RGNNV	Japón[10]
Pleuronectiformes				
Citharidae	*Citharoides macrolepidotus*	*"Branched ray flounder"*	RGNNV	China[2]
Paralicthyidae	*Paralichthys olivaceus*	Platija japonesa	RGNNV	Japón, Corea[10-12,81-83]
Pleuronectidae	*Pleuronectes platessa*	Solla	ND	Noruega[17]
	P. yokohamae	Platija jaspeada	RGNNV	Japón[10]
	Pseudopleuronectes americanus	Solla roja	BFNNV	Canadá[84]
	Kareius bicoloratus	Platija de roca	RGNNV	Korea[12]
	Verasper moseri	"Barfin flounder"	BFNNV	Japón[13,14]
	Hippoglossus hippoglossus	Fletán del Atlántico	BFNNV	Noruega, Reino Unido[85-87]
Scianidae	*Sciaenops ocellatus*	Corvina ocelada	RGNNV	China[2]
Scophtalmidae	*Scophtalmus maximus*	Rodaballo	TNNV	Noruega[52], España[88]
	Solea solea	Lenguado común	BFNNV	Reino Unido[14]

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Orden y Familia	Nombre específico	Nombre común	Genotipo	Lugar
	S. senegalensis	Lenguado senegalés	SJNNV – RG/SJ	Península Ibérica[77,89]
Scorpaeniformes				
Scorpaenidae	*Pterois lunulate*	"*Luna lionfish*"	RGNNV	Japón[10]
	Scorpaena scrofa	Cabracho	RGNNV	Grecia[4]
Sebastidae	*Sebastes inermis*	Perca de roja japonesa	RGNNV	Japón[10]
	Sebastes oblongus	"Oblong rockfish"	RGNNV	Corea[10,83]
	S. schlegelii	Pez de roca coreano	RGNNV	Corea[10,12]
	S. marmoratus	"*Rockfish*"	RGNNV	Japón[10]
	S. pachycephalus	"*Brassbloteched rockfish*"	RGNNV	Japón[10]
Synanceiidae	*Inimicus japonicus*	Pez escorpión	RGNNV	Japón[10]
Triglidae	*Chelidonichtys lucerna*	Bejel	RGNNV	España[6]
	Lepidotrigla dieuzeidei	Cabete espinoso	RGNNV	Grecia[4]
	Trigla lyra	Garneo	RGNNV	Italia[7]
Siluridae				
Plotosidae	*Plotosus lineatus*	Patuna rayada	RGNNV	Japón[10]
Syngnathiformes				
Centriscidae	*Aeoliscus strigaus*	Pez navaja	ND	Korea, Japón[3,66]
Fistuliridae	*Fistularia villosa*	Corneta colorada	RGNNV	China[2]
Tetraodontiformes				
Diodontidae	*Diodon holocanthus*	Pejerizo balón	RGNNV	Japón[10]
Monocanthidae	*Thammnaconus modestus*	Pez lima	RGNNV	Japón[10]
	Stephanolepsis cirrhifer	"Threadsail filefish"	ND	Tailandia[10,76]
	Thamnaconus modestus	"*Black scrapper*"	RGNNV	Japón[10]
Tetraodontidae	*Takifugu pardalis*	"*Panther puffer*"	RGNNV	Japón[10]
	T. rubripes	"Tiger puffer"	TPNNV	Japón[10]
Trachichthyiformes				
Trachichthyidae	*Hoplostethus mediterraneus*	Reloj mediterráneo	ND	Italia[26]

[1]Bandín y col. J Fish Dis **2014**, 37, 597-607. [2]Gomez y col. J Fish Dis **2004**, 27, 603-608. [3]Gomez y col. J Vet Sci **2006**, 7, 369–374. [4]Bitchava y col. J Fish Dis. **2019**, 42, 1773-1783. [5]Berzak y col. Dis Aquat Org **2019**, 133, 7-17. [6]Haddad-Boubaker y col. Fish Pathol **2014**, 49, 53-56. [7]Ciulli y col. Vet Res Commun **2007**, 31, 221-224. [8] Munday y col. J Fish Dis **2002**, 127–142. [9]Moody y col. Dis Aquat Org **2009**, 87, 151-160. [10]Moreno y col. Appl Environ Microbiol **2014**, 80, 6560–6571. [11]Yoshikoshi e Inoue. Fish Dis **1990**, 13, 69–77. [12]Kim y col. Emerg Dis **2018**, 65, 1557–1567. [13]Muroga. Aquaculture **2001**, 202, 23–44. [14]Skliris y col. Virus Res **2001**, 75, 59–67. [15]Mézeth y col. Virus Res **2007**, 130, 43–52. [16]Gagné y col. Dis Aquat Organ. **2004**, 62, 181–189. [17]Nylund y col. Arch Virol. **2008**, 153, 541–547. [18]Johnson y col. J Aquat Anim Health **2002**, 14, 124–133. [19]Mori y col. Dis Aquat Organ **2003**, 57, 19–26. [20]Mao y col. Arch Virol **2015**, 160, 2237–2248. [21]Panzarin y col. Infect genet Evol **2012**, 12, 63-70. [22]Ucko y col. J Fish Dis **2004**, 27, 459-469. [23]Athanassopoulou y col. J Fish Dis **2003**, 26, 361-365. [24]Sakamoto y col. Fish Pathol **2008**, 43, 19-27. [25]Zorriehzahra y col. Vet Microb **2016**, 190, 27-37. [26]Giacopello y col. J Fish Dis **2013**, 36, 819-821. [27]Chérif y col. Fish Aquac J **2017**, 8, 2-7. [28]Ransangan y col. Aquaculture **2011**, 315, 327–334. [29]Sharma y col. Aquac Int **2019**, 27, 279–286. [30]Chi y col. Dis Aquat Organ **2003**, 55, 221–228. [31]Li y col. J. Fish Dis. **2018**, 41, 1177–1180. [32]Ma y col. Arch Virol **2015**, 160, 2979-2989. [33]Liu y col. J Fish Dis **2015**, 38, 533-540. [34]Panzarin y col. Arch Virol **2010**, 155, 1193–1203. [35]Binesh y col. Arch Vir **2012**, 1588,

1589-1594. [36]Chi y col. EAFP **2001**, P-O-049. [37]Ransangan y col. Vet Microbiol **2010**, 145, 153-157. [38]Jung y col. Bullettin Fac Bioresour **1996**, 16, 9-16. [39]David y col. J Fish Dis **2010**, 33, 451-454. [40]Korsnes y col. Dis Aquat Org **2017**, 126, 43-50. [41]Abdullah y col. Aquac Reports **2017**, 7, 57-65. [42]Bellance y col. Caraibes Med **1998**, 2, 105-114. [43]Breuil y col. Aquaculture **1991**, 97, 109-116. [44]Gomez y col. Aquaculture **2010**, 302, 158-163. [45]Toffolo y col. Mol Phylogenet Evol **2007**, 43, 298-308. [46]Bovo y col. Virus Res **1999**, 63, 143-146. [47]Le Breton y col. J Fish Dis **1997**, 20, 145-151. [48]Lopez-Jimena y col. J Appl Microbiol **2010**, 109, 1361-1369. [49]Dalla Valle y col. J Fish Dis **2000**, 23, 321-327. [50]Comps y col. Aquaculture **1996**, 143, 113-121. [51]Pavoletti y col. Boll Soc Patol Ittica **1998**, 23, 24-33. [52]Johansen y col. J Fish Dis **2004**, 27, 591-601. [53]Curtis y col. J Fish Dis **2001**, 24, 263-271. [54]Sugaya y col. Fish Dis **2009**, 32, 815-824. [55]Nakai y col. Isr J Aquac **2010**, 61, 198-207. [56]Chi y col. J Fish Dis **1997**, 20, 185-193. [57]Mori y col. Fish Pathol **1991**, 26, 209-210. [58]Lai y col. J Fish Dis **2001**, 24, 299-309. [59]NaveenKumar y col. Aquac Int **2017**, 25, 1543-1554. [60]Maeno y col. Fish Pathol **2002**, 37, 87-89. [61]Vendramin y col. BMC Vet Res **2013**, 9, 1-7. [62]Kara y col. J Fish Dis **2014**, 37, 273-278. [63]Lin y col. Virology **2001**, 290, 50-58. [64]Agnihotri y col. Virol Reports **2016**, 6, 25-31. [65]Valencia y col. Dis Aquat Organ **2019**, 135, 49-58. [66]Nakai y col. Fish Pathol **1994**, 29, 211-212. [67]Fukuda y col. Fish Pathol **1996**, 31, 165-170. [68]Sohn y col. J Fish Pathol **1998**, 11, 97-104. [69]Tan y col. J Gen Virol **2001**, 82, 647-653. [70]Chua y col. Dis Asian Aquacult **1995**, 235-241. [71]Hegde y col. Aquaculture **2002**, 213, 55-72. [72]Khumaidi y col. AIP Conf Proc **2019**, 2120, 070007. [73]Knibb y col. Sci Rep **2017**, 7, 1-11. [74]Ransangan y col. Vet Microbiol **2012**, 156, 16-44. [75]Zafran y col. Fish Pathol **2000**, 35(2), 95-96. [76]Pirarat y col. Res Vet Sci **2009**, 87, 97-101. [77]Olveira y col. J Gen Virol **2009**, 90, 2940-2951. [78]Toffan y col. Sci Rep **2017**, 7, 46755. [79]Castric y col. Dis Aquat Organ **2001**, 47, 33-38. [80]García-Rosado y col. Int Microbiol **2007**, 10, 193-199. [81]Nishizawa y col. J Gen Virol **1995**, 76, 1563-1569. [82]Nishizawa y col. Appl Environ Microbiol **1997**, 63, 1633-1636. [83]Kim y col. Korean J Fish Aquat Sci **2002**, 35, 237-241. [84]Barker y col. Dis Acuat Organ **2002**, 49, 99-105. [85]Grotmol y col. Bull Eur Assoc Fish Pathol **1995**, 15, 176-180. [86]Grotmol y col. Dis Aquat Organ **2000**, 39, 79-88. [87]Starkey y col. J Fish Dis **2000**, 23, 419-422. [88]Olveira y col. Aquaculture **2013**, 406-407, 125-130. [89]Thiéry y col. J Gen Virol **2004**, 85, 3079-3087.

Ambas combinaciones genómicas RGNNV/SJNNV y SJNNV/RGNNV se han observado en peces cultivados en el sur de Europa (Olveira y col., 2009; Panzarin y col., 2012; Toffan y col., 2017). Sin embargo, el genotipo recombinante más frecuente es el RGNNV/SJNNV, causante de un 2 % de los episodios reportados hasta la fecha (Bandín y Souto, 2020). Ejemplo de ello es un estudio realizado por Panzarin y col. (2012), que reveló que de un total de 23 cepas con ARN2 tipo SJNNV, 22 de ellas presentaban la molécula de ARN1 tipo RGNNV. Este genotipo se detectó en cultivos de larvas y juveniles de doradas, lenguados y lubinas con signos clínicos de la patología y que mostraban ciertos niveles de mortalidad (Olveira y col., 2009; Panzarin y col., 2012), y en doradas asintomáticas (Toffan y col., 2017). Sin embargo, también se ha detectado en la naturaleza el primer aislado RGNNV/SJNNV en peces salvajes obtenido a partir de sardina (*Sardina pilchardus*) (Bitchava y col., 2019).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Por último, recientemente se realizó en las costas italianas el primer aislamiento de VNNV a partir de un vertebrado superior; se trataba de tortugas asintomáticas de la especie *Caretta caretta* (L.), aunque no se identificó el genotipo (Fichi y col., 2016).

II.4.2. Vertebrados de agua dulce

El primer caso de una infección natural por betanodavirus en peces de agua dulce se produjo en guppy (*Poicelia reticulata*), y fue causada por el genotipo RGNNV (Hegde y col., 2003). Posteriormente, también se detectó el genotipo SJNNV en esturiones (*Acipenser* sp.) con signos clínicos (Athanassopoulou y col., 2004), anguilas (*Anguilla anguilla*) y pez gato chino (*Parasilurus asotus*), cultivados en Taiwán (Chi y col., 2003).

A lo largo de los últimos años, el VNNV se ha detectado en numerosas especies de agua dulce pertenecientes a 12 familias: *Acipenseridae*, *Anguillidae*, *Cyprinidae*, *Poeciliidae*, *Blenniidae*, *Centrarchidae*, *Cichlidae*, *Eleotridae*, *Moronidae*, *Percidae*, *Plotosidae* y *Siluridae* (**Tabla 3**). La mayor parte de cepas eran RGNNV (75 %), si bien en algunos casos no se determinó el genotipo. Aunque estas infecciones se produjeron principalmente en Asia, también se han dado casos en España, Italia y Grecia (Bandín y Souto, 2020). Como dato curioso, el VNNV también se detectó en pez hoja del Amazonas (*Monocirrhus polyacanthus*) y piraña de vientre rojo (*Pygocentrus nattereri*) en un acuario de Corea del Sur, aunque los autores indican que el contagio de los individuos probablemente ocurriese mediante transmisión horizontal durante el transporte (Gomez y col., 2008a).

No se han detectado brotes patológicos desencadenados por cepas del genotipo BFNNV o TPNNV en individuos de agua dulce (Nylund y col., 2008).

Tabla 3. Relación de especies de agua dulce afectadas por el VNNV.

Orden y Familia	Nombre específico	Nombre común	Genotipo	Lugar
Ascipneseriformes				
Ascipenseridae	*Acipenser gueldenstaedtii*	Esturión	SJNNV	Grecia[1]
Anguiliformes				
Anguillidae	*Anguilla anguilla*	Anguila europea	RGNNV	Taiwán, India[2]

Orden y Familia	Nombre específico	Nombre común	Genotipo	Lugar
Cypriniformes				
Cyprinidae	*Carassius auratus*	*Goldfish* / Carpa dorada	nd	
	Epalzeorhynchos frenatum	Rainbow	nd	India[3]
Cyprinodontiformes				
Poeciliidae	*Poecilia reticulata*	Guppy	RGNNV	Singapur[4]
Perciformes				
Blenniidae	*Salaria flubiatilis*	Blenny" de agua dulce	RGNNV	España[5]
Centrarchidae	*Micropterus salmoides*	Perca americana	RGNNV	Italia[6]
Cichlidae	*Oreochromis niloticus*	Tilapia	RGNNV	Europa, Indonesia[7,8]
Eleotridae	*Oxyeleotris lineolatus*	Sleepy cod	RGNNV	Australia[9]
Moronidae	*Morone saxatilis x M. chrysops*	Híbrido de lubina rayada atlántica	RGNNV; SJNNV	Italia[6]
Percidae	*Sander lucioperca*	Lucioperca	RGNNV	Italia[6]
Siluriformes				
Plotosidae	*Tandanus tandanus*	Pez gato	nd	Australia[11]
Siluridae	*Parasilurus asotus*	Pez gato japonés	RGNNV	Taiwán[2]

(1)Athanassopoulou y col. Dis Aquat Organ **2004**, 60, 247–252. (2)Chi y col. Dis Aquat Organ **2003**, 55, 221–228. (3)Jithendran y col. Asian Fish Sci **2011**, 24, 12-19. (4)Hegde y col. Arch Vir **2003**, 148,575-586. (5)Vendramin y col. J Fish Dis 2012, 35, 867-871. (6)Bovo y col. Dis Aquat Organ **2011**, 96, 45–54. (7)Bigarré y col. J Fish Dis **2009**, 23, 667-673. (8)Keawchoren y col. J Fish Dis **2015**, 38, 49-54. (9) Moody y col. Dis Aquat Organ **2009**, 87, 151-160. (10)Munday y col. J Fish Dis **2002**, 127-142.

II.4.3. Invertebrados

El VNNV ha sido descrito en 24 especies de invertebrados marinos, pertenecientes a 16 familias y 12 órdenes, y ninguno de ellos mostró signos clínicos de patología (**Tabla 4**). La mayoría son moluscos bivalvos que acumulan partículas virales en su interior, aunque también se ha detectado en otros moluscos como los gasterópodos y cefalópodos, y en crustáceos (Bandín y Souto, 2020).

Entre los bivalvos en los que se detectó el VNNV se encuentran el mejillón mediterráneo, *Mytilus galloprovincialis* (Bitchava y col., 2019;

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Errani y col., 2021; Gomez y col., 2008a,b; Kim y col., 2018b; Volpe y col., 2018), la almeja japonesa, *Ruditapes philippinarum* (Ciulli y col., 2010; Kim y col., 2018c; Panzarin y col., 2012; Volpe y col., 2018), la escupiña, *Venus verrucosa* (Bitchava y col., 2019), y la ostra rizada, *Crassostrea gigas* (Bitchava y col., 2019; Ciulli y col., 2010; Kim y col., 2018c; Volpe y col., 2018). En la mayoría, la cepa responsable fue la RGNNV, aunque también se detectó el recombinante RGNNV/SJNNV (Errani y col., 2021) y un caso de BFNNV (Kim y col., 2018c). La detección del VNNV en ostra permitió la descripción de un nuevo genotipo potencial, el KSNNV (Kim y col, 2018c).

Tabla 4. Lista de especies de invertebrados en las que se ha detectado el VNNV.

Orden y Familia	Nombre específico	Nombre común	Genotipo	Lugar
Anostraca				
Artemiidae	*Artemia salina*	Artemia	RG/SJ	Chipre[1]
Arcida				
Arcidae	*Tegillarca granosa*	Almeja de sangre	RG, BF	Corea, Japón[2]
Decapoda				
Pandalidae	*Plesionka hterocarpus*	Quisquilla	RGNNV	Mediterráneo[3]
Myopsida				
Loginidae	*Alloteuthis media*	Calamar mediano	RGNNV	Mediterráneo[3]
Mytiloida				
Mytilidae	*Mytilus edulis*	Mejillón	RG, BF	Corea[2]
	M. galloprovincialis	Mejillón mediterráneo	RGNNV	Korea[2,5], Italia[6,7], Grecia[4]
Oegopsida				
Enoploteudiae	*Abralia veranyi*	Calamar de ojos	RGNNV	Mediterráneo[3]
Ommastrephidae	*Todarodes pacificus*	*Calamar volador japonés*	RGNNV	Japón[6]
Ostreoida				
Ostreidae	*Ostrea edulis*	Ostra plana europea	RGNNV	Grecia[4]
	Cassostrea gigas	Ostra del Pacífico	RG, BF	Corea[2,5,9], Francia[8]
Octopoda				
Octopodidae	*Octopus vulgaris*	Pulpo	ND	Italia[10]
Decapoda				
Palinuridae	*Pamulirus versicolor*	Langosta espinosa	ND	Japón[11]
Pandalidae	*Pandalus hypsinotus*	Camarón malacho	RGNNV	Corea[6]

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Orden y Familia	Nombre específico	Nombre común	Genotipo	Lugar
Penaeidae	*Marsupenaeus japonicus*	Camarón kuruma	RGNNV	Mediterráneo[12]
Portunidae	*Charybdis bimaculata*	"*Charybdid crab*"	RGNNV	Corea[6]
Pectinida				
Pectinidae	*Patinopecten yessoensis*	Vieira japonesa	RG, BF	China, Japón[2]
Veneroida				
Veneridae	*Ruditapes philippinarum*	Almeja de Manila	RGNNV	Italia[5,8]
	Meretrix usoria	Almeja dura asiática	RG, BF	Corea[2]
	Cyclina sinensis	Almeja negra	BFNNV	China[2]
	Venerupis philippinarum	Almeja japonesa	RG, BF	Corea, China, Japón[2]
	Mercenaria mercenaria	Chirla mercenaria	BFNNV	China[2]
	Callista brevisiphonata	Almeja arrugada	BFNNV	China[2]
	Venus verrucosa	Escupiña	RGNNV	Grecia[4]
Neogastropoda				
Muricidae	*Stramonita haemastoma*	Caracola de piedra	RGNNV	Grecia[4]

(1)Panzarin y col. Inf Gen Evo **2012**, 12, 63-70. (2)Kim y col. Emerg Dis **2018**, 65, 1557–1567. (3)Johstone y col. Viruses **2022**, 14, 328-342. (4) Bitchava y col. J Fish Dis. **2019**, 42, 1773-1783. (5)Gomez y col. J Intebr Pathol **2008**, 97, 197-202. (6)Volpe y col. J Fish Dis 2018, 41, 603-611. (7) Errani y col. J App Microbiol **2021**, 130, 994-1008. (8) Ciulli y col. J Biotech **2010**, 150S,S1-D576. (9) Kim y col. J Fish Dis **2019**, 42, 519-531. (10)Fichi y col. Dis Aquat Organ **2015**, 115, 147-156. (11)Gomez y col. J Vet Sci **2006**, 7, 369–374. (12)Berzak y col. Dis Aquat Org **2019**, 133, 7-17.

También se ha encontrado el VNNV en moluscos gasterópodos, como el "*redmouthed rock shell*" (*Stramonita haemastoma*) en Grecia (Bitchava y col., 2019), en opistobranquios (Panzarin y col., 2012), y en cefalópodos como el pulpo (*Octopus vulgaris*) o el calamar (*Alloteuthis media* y *Abralia veranyi)* (Fichi y col., 2015; Johnstone y col., 2022).

En cuanto a los crustáceos, se ha detectado el genotipo RGNNV en el cangrejo conocido como "*two spot swimming* crab" (*Charybdis bimaculata*), el camarón "*southern humpback shrimp*" (*Pandalus hypsinotus*) y en la langosta azul (*Palinurus versicolor*) (Gomez y col., 2006, 2008a), así como una cepa recombinante RGNNV/SJNNV en *Artemia salina* (Panzarin y col., 2012).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

II.5. Transmisión

El VNNV se transmite muy eficazmente desde los individuos infectados a otros sanos, ya sea de forma horizontal o vertical, lo que facilita la aparición de epizootias y la infección de nuevas especies.

En la transmisión horizontal, la liberación de partículas infectivas se produce mediante las branquias o la piel de los peces portadores del virus (Krishnan y col., 2021; Souto y col., 2018a). Esta vía de diseminación ha sido descrita entre peces enfermos o portadores asintomáticos y peces sanos, bien por contacto directo o mediante la columna de agua (Bandín y Souto, 2020; Breuil y col., 2002). Además, también se ha descrito transmisión horizontal entre individuos pertenecientes a distintas especies, como en el caso de las doradas y lubinas (Castric y col., 2001), o el rodaballo y bacalao del Atlántico (Korsnes y col., 2012). El VNNV también está presente en invertebrados marinos como moluscos o crustáceos que contribuyen a la dispersión viral mediante liberación de partículas infectivas a la columna de agua (Bitchava y col., 2019; Gomez y col., 2008b; Panzarin y col., 2012; Volpe y col., 2018). Estos invertebrados marinos incluyen también especies que forman parte del zooplancton, como rotíferos, el crustáceo *Artemia*, y/o copépodos, que transmiten el virus al siguiente eslabón en la cadena trófica mediante la vía oral (Chi y col., 2003; Gomez y col., 2010; Skliris y Richards, 1998).

La transmisión vertical del VNNV se describió tras el hallazgo de partículas virales en el tejido gonadal de numerosos reproductores de jurel dentón (Arimoto y col., 1992, Mori y col., 1998; Nguyen y col., 1997), dorada y lubina (Valero y col., 2015), *barfin flounder* (Watanabe y col., 2000), y fletán del Atlántico (Johansen y col., 2002). También se detectó el virus en huevos y en el interior del embrión de lubinas (Azad y col., 2006a; Breuil y col., 2002), indicando que el contagio podría ocurrir durante la fecundación (Kuo y col., 2012), o por contaminación mediante el contacto con las heces del pez durante la puesta (Nguyen y col., 1997).

Ambas vías de transmisión se ven favorecidas por la presencia, tanto en plantas de cultivo como en el medio natural, de individuos infectados de forma subclínica. El VNNV se mantiene en su interior durante largos períodos de tiempo y, ante cambios en las condiciones ambientales como la temperatura

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

del agua (Souto y col., 2015c; Tanaka y col., 1998), o en la población, como cambios en la densidad de individuos (Arimoto y col., 1993), se reactiva pudiendo diseminarse hacia otros individuos (Shetty y col., 2012).

II.6. Especificidad de huésped

La región hipervariable T4, mencionada anteriormente por su papel en la clasificación filogenética, también se ha identificado como la responsable de la especificidad de hospedador de los diferentes genotipos de VNNV (Ito y col., 2008; Iwamoto y col., 2004).

Las infecciones experimentales en larvas de mero carcelario y jurel dentón realizadas con cepas SJNNV y RGNNV que contenían insertos de diferentes regiones del ARN2 del otro virus demostraron que solo las quimeras que contenían la región T4 de la cepa SJNNV o RGNNV producían niveles de mortalidad similares a los de la cepa parental en jurel dentón y mero, respectivamente (Ito y col., 2008). Otros estudios han demostrado la patogenicidad diferencial de algunos genotipos para diferentes especies de peces. Así, el rodaballo muestra una baja susceptibilidad a un recombinante RGNNV/SJNNV obtenido de lenguado senegalés (Souto y col., 2016), especie en la que este genotipo resulta altamente patogénico (Souto y col., 2018a), mientras que las lubinas son especialmente sensibles a la infección por el genotipo RGNNV, pero no a los restantes (Souto y col., 2015a) ni a una cepa tipo RGNNV aislada de dorada (Vendramin y col., 2014). Estas diferencias en la patogenicidad también implican un retraso en la replicación durante la infección en una especie distinta a la de origen, tal y como se ha visto en el lenguado senegalés infectado con una cepa recombinante y las parentales, o en infecciones experimentales con cepas RGNNV y SJNNV en jurel dentón y mero (*Epinephelus bruneus*) (Banu y col., 2007; Souto y col., 2018a). Aunque se desconoce el factor subyacente a este fenómeno, se ha propuesto que las mutaciones en los aminoácidos 247 y 270 en la proteína de la cápside (localizados en la región T4) podrían estar implicados en la especificidad de huésped y habrían favorecido la colonización de nuevas especies, como el lenguado (Olveira y col., 2009; Souto y col., 2015b). Estos cambios suponen una mayor afinidad de la cápside tipo SJNNV hacia individuos de dorada y lenguado, favoreciendo una replicación viral más

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

eficiente (Bandín y Dopazo, 2011; Souto y col., 2015c). Además de estas mutaciones en la proteína de la cápside, los recombinantes RGNNV/SJNNV poseen 6 mutaciones localizadas entre las posiciones 1-445 del ARN1. Esta región es la responsable de la adaptación a la temperatura, por lo que también podría desempeñar un papel en la adaptación a un nuevo hospedador (Hata y col., 2010; Souto y col., 2015c).

La diferente patogenicidad de los betanodavirus tiene especial relevancia para el desarrollo de vacunas. En este sentido, la inmunización de lubinas con una cepa RGNNV inactivada protege frente a la infección por este mismo genotipo, mientras que los niveles de anticuerpos neutralizantes en la inmunización con una cepa SJNNV son muy bajos (Pascoli y col., 2019).

II.7. La enfermedad: Encefalopatía y Retinopatía Viral (ERV)

II.7.1. Signos clínicos

La Organización Internacional de Epizootias (OIE) denomina la patología causada por el VNNV como Encefalopatía y Retinopatía Viral (ERV) o Necrosis Nerviosa Viral (NNV) (OIE, 2019). Se trata de una enfermedad especialmente devastadora durante estados de desarrollo tempranos (larvas y juveniles). Los signos clínicos difieren ligeramente entre especies, aunque se relacionan de forma directa con la naturaleza neurotrópica del virus (Costa y Thompson, 2016). La ERV cursa principalmente con la alteración del comportamiento natatorio, dando lugar a una natación rápida, en espiral, formando giros o bucles horizontales, y/o con reposo en el fondo del tanque o en la superficie de la lámina de agua en los peces planos y bilaterales, respectivamente. También se detecta una reducción o pérdida de apetito, lo que puede desembocar en un estado de delgadez extrema.

Otros signos observados con frecuencia durante el curso de la patología son los cambios en la coloración de la piel, tanto oscurecimiento como palidez dependiendo de cada especie (Glazebrook y col., 1990; Grotmol y col., 1997), hemorragias cerebrales, exoftalmia y/o hinchazón de la vejiga natatoria (Bandín y Souto, 2020; Breuil y col., 1991; Doan y col., 2017; Mori y col. 1992; Shetty y col., 2012). Por otra parte, también se han detectado casos de infecciones subclínicas en diferentes especies de vertebrados marinos (Baeck y col., 2007; Dalla Valle y col., 2000), como el salmón atlántico (*Salmo salar*),

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

que, a pesar de contener partículas virales en el tejido cardiaco, no desarrollan signos de infección (Grotmol y col., 1997), las doradas (Castric y col., 2001), el fletán (*Hippoglosus hippoglosus*) y el bacalao (*Gadus morhua*), en los que se observan grandes agregados virales en el cerebro y retina (Gjessing y col., 2009; Johansen y col., 2002), el rodaballo (Olveira y col., 2013), o el mero marrón punteado (*Epinephelus chlorostigma*) (Gomez y col., 2004). Sin embargo, las infecciones detectadas hasta la fecha en los peces de acuario y los invertebrados cursan de manera subclínica (Gomez y col., 2006).

II.7.2. Lesiones histológicas

La primera descripción de los daños histológicos provocados por esta patología es de Glazebrook y col. (1987), aunque hasta el año 1990, no se detectó la vacuolización y necrosis del sistema nervioso central (SNC), lo que dio lugar a la denominación de la patología como necrosis nerviosa (Yoshikoshi e Inoue, 1990).

En general, durante las primeras fases de la infección se forman agregados virales en la médula espinal y, posteriormente se produce la vacuolización y necrosis del tejido nervioso (Mladineo, 2003; Péducasse y col., 1999). Las lesiones son más notables en el cerebro anterior que en el posterior, y afectan fundamentalmente a la materia gris (Munday y col., 2002), aunque también a los lóbulos olfatorio y óptico, el cerebelo, la médula espinal y oblonga, y a la capa de conos y bastones de la retina (Mladineo, 2003; Munday y col., 2002). No se producen lesiones en el riñón, hígado o gónadas (Mladineo, 2003), aunque se puede observar hiperplasia y/o degeneración del epitelio oral, opercular o de la piel (Nguyen y col., 1996).

Al igual que los signos clínicos, las lesiones histológicas varían en función del grado de desarrollo del individuo (Athanassopoulou y col., 2003; Glazebrook y col., 1990; Nguyen y col., 1996). Durante los estados larvarios, la infección afecta principalmente a la médula oblonga y la médula espinal donde se produce una gran vacuolización, mientras que, en los individuos adultos, a pesar de contener una mayor carga viral, la vacuolización ocurre de forma moderada (Mladineo, 2003).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

II.8. Vías de infección y diseminación viral en el individuo

En condiciones naturales, la colonización de un individuo por parte del VNNV se produce a través de las células epiteliales de la superficie corporal, de la cavidad nasal, del intestino y de las branquias, ya que están en contacto directo con el medio acuático.

Al inicio de la infección en lenguado, Souto y col. (2018a) evidenciaron la presencia de partículas virales en la piel de todo el cuerpo (incluyendo las aletas), demostrando que las células epiteliales son el principal portal de entrada. Las partículas virales podrían penetrar hacia el músculo y espacio intramuscular, como se ha descrito en perca gigante y lubina, fletán o mero carcelario (Azad y col., 2006b; Grotmol y col., 1999; Krishnan y col., 2020; Péducasse y col., 1999; Souto y col., 2018a).

Los epitelios nasal e intestinal también participan en la introducción del VNNV, aunque, según se ha descrito en mero carcelario, el epitelio olfativo no permite la replicación del virus (Tanaka y col., 2004). Las partículas virales presentes en el agua y en el alimento alcanzan el epitelio intestinal mediante la vía oral, como se ha observado en jurel dentón y lenguado senegalés (Skliris y Richards, 1999; Souto y col., 2018). Sin embargo, en este tejido no se han aislado partículas infectivas, lo que podría deberse a un fallo en el proceso de maduración tras la replicación viral (Lopez-Jimena y col., 2011), o a la formación de inmunocomplejos (Húsgard y col., 2001; Nguyen y col., 1997; Péducasse y col., 1999; Souto y col. 2018a).

La infección por VNNV también se puede producir a través del epitelio de las branquias, que poseen una superficie similar a la de la piel y permiten la entrada de patógenos debido al paso continuo de agua (Ellis y col., 2017; Krishnan y col., 2021; Souto y col., 2018a).

Tras la colonización del tejido epitelial, el VNNV se dispersa mediante la vía neuronal/axonal desde los nervios periféricos, incluyendo el nervio vago, hacia la médula espinal y la masa cerebral (Grotmol y col., 1999; Ikenaga y col., 2002; Munday y col., 2002; Nguyen y col., 1996, 1997; Skliris y Richards, 1999). Según Nguyen y col. (1996), el virus se detecta en primer lugar en la región caudal de la médula espinal, desde donde disemina hacia la región anterior del cuerpo, alcanzando en primer lugar el cerebro y, en la fase

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

tardía de la infección, la retina. Sin embargo, la dispersión exacta del virus en el interior del organismo varía ligeramente en función de la cepa y la especie. Por ejemplo, en la lubina asiática, el lóbulo óptico y la retina son los sitios primarios donde se observan lesiones, mientras que en pez loro japonés (*Ophlegnatus fasciatus*), se observa en la médula y ganglios espinales (Renault y col., 1991; Yoshikoshi e Inoue, 1990). En jurel dentón, primero se produce la vacuolización y necrosis en la médula espinal, concretamente en la región que rodea la vejiga natatoria, sugiriendo que ese podría ser el órgano donde se inicia la replicación viral (Nguyen y col., 1996). Por otra parte, según Souto y col. (2018b), las cepas RGNNV/SJNNV son las más eficientes a la hora de alcanzar el cerebro del lenguado que las cepas parentales, especialmente la RGNNV, lo que sugiere que el evento de recombinación supuso una ventaja para la infección de esta especie.

Tras una fase inicial de replicación en los tejidos nerviosos, se produce una infección generalizada en la que el VNNV se detecta en tejidos no neurológicos, incluyendo la sangre. Esto sugiere que, en etapas posteriores de la infección, el VNNV se dispersa en el interior del organismo mediante la vía hematógena (Kim y col., 2018a; Olveira y col., 2008). Sin embargo, algunos autores indican que la viremia tiene lugar al inicio de la infección y precede a la dispersión neuronal (Korsnes y col., 2009).

Otros órganos o tejidos que no tienen origen nervioso y en los que se ha detectado replicación viral son el tejido cardíaco del fletán atlántico (Grotmol y col., 1997), y músculo, estómago e intestino, riñón, hígado, bazo y gónadas de lubina, perca gigante, dorada, jurel dentón, rodaballo y bacalao atlántico (Azad y col., 2006b; Chi y col., 2003; Grove y col., 2006; Korsnes y col., 2012; Lopez-Jimena y col., 2011; Nguyen y col., 1997; Valero y col., 2015).

Finalmente, tras la fase de infección aguda, la liberación de las nuevas partículas virales se produce a través del tejido epitelial, incluyendo también el epitelio de las branquias (Krishnan y col., 2021; Souto y col., 2018a).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

II.9. Interacción VNNV – célula huésped

La interacción del VNNV con las células del huésped, se produce mediante el dominio de protrusión (dominio P), localizado en el extremo C-terminal de la proteína de la cápside (Gye y Nishizawa, 2021; Low y col. 2017). En las cepas tipo SJNNV, este dominio abarca desde el aminoácido 238 al 340 (Chen y col., 2015a; Ito y col., 2008; Iwamoto y col., 2004), región que contiene los aminoácidos 247 y 270 descritos por Olveira y col. (2009) y cuyo papel como determinantes de patogenicidad y en la especificidad de huésped ha sido comentado anteriormente.

Los receptores celulares son biomoléculas expuestas en la cara externa de la membrana celular (proteínas, lípidos o carbohidratos) que en estado glicosilado permiten la unión de los betanodavirus (Liu y col. 2005). Se ha demostrado que el tratamiento de las células SSN-1 (del inglés, *Snakehead-fish*) con tunicamicina y neuraminidasa reduce la unión de los betanodavirus a la célula, indicando que el ácido siálico podría ser uno de los receptores celulares con los que interacciona el VNNV (Adachi y col., 2008).

También se han identificado proteínas pertenecientes a la familia de choque térmico como posibles receptores o correceptores celulares de betanodavirus. Entre ellas se encuentra la proteína HSC70 (del inglés, *heat shock cognate* 70), identificada en células GF-1 (del inglés, *grouper fin*-1) (Chang y Chi, 2015), que parece interactuar con los glucosaminoglucanos de la membrana para favorecer la unión de la proteína de la cápside (Chen y col., 2015a), o las proteínas HSP90ab1 y HSP60 identificadas en la línea celular obtenida de cerebro de lubina asiática *Lateolabrax japonicus* (LJB; del inglés, *L. japonicus brain*) (Huang y col., 2020; Zhang y col., 2020, 2022).

La proteína Nectina-4 también ha sido caracterizada en la línea celular SSN-1 como receptor del VNNV (Krishnan y col., 2019). La síntesis de esta proteína se incrementa en cerebro y branquias durante la infección por VNNV y favorece la entrada del virus en el parénquima cerebral (Krishnan y col., 2020).

Otras proteínas celulares que podrían estar implicadas en la interacción con el VNNV son las relacionadas con la unión al calcio o las que sintetizan

USC UNIVERSIDADE SANTIAGO DE COMPOSTELA

el ATP, como la creatina quinasa, ya que se ha visto que favorece la replicación del virus (Huang y col., 2020).

II.10. Ciclo viral y efecto del virus sobre el ciclo celular

Como resultado de la interacción del VNNV con las células del huésped se activan determinadas rutas metabólicas, como la endocitosis mediada por clatrina (CME, del inglés *clathrin-mediated endocytosis*) o, en situaciones en la que la carga viral es elevada, la pinocitosis (Liu y col., 2005).

La endocitosis mediada por clatrina es un proceso dependiente de una elevada concentración de colesterol en la membrana celular, del citoesqueleto (responsable del transporte de los endosomas hasta los lisosomas) y del pH (necesario para la fusión del lisosoma y los endosomas, y liberación del virus en el citoplasma) (Huang y col. 2017, 2020). Aunque todavía no se ha descrito el mecanismo por el cual el material genético del VNNV es liberado del interior del virión en el citoplasma de la célula, la proteína HSC70 mencionada anteriormente, podría tener un papel en la retirada de las moléculas de clatrina de la vesícula en la que se internaliza el VNNV (Liu y col. 2005; Low y col., 2017).

En la fase de infección temprana se produce la síntesis de proteínas no estructurales, como la polimerasa viral, mediante traducción de la molécula del ARN1. Esta replicasa viral sintetiza la molécula complementaria a cada hebra de ARN, obteniéndose un ARN de sentido negativo que servirá como molde para la replicación del genoma viral. La mayoría de los virus de ARN replican en el citoplasma en asociación con membranas de orgánulos celulares como la mitocondria, el aparato de Golgi, el retículo endoplasmático o los endosomas (Ahlquist y col., 2003; Guo y col., 2004; Low y col., 2017; Mézeth y col., 2007). La polimerasa del VNNV, contiene un dominio transmembrana de localización mitocondrial, denominado TMD (del inglés, *transmembrane domain*), que la dirige hacia ese orgánulo para iniciar la replicación (Ahlquist y col., 2003; Guo y col., 2004).

En esta etapa también se produce la expresión de la molécula de ARN3, a partir de la cual se sintetizan las proteínas no estructurales B1 y B2. En las primeras 12 -24 h, la proteína B1 mantiene la viabilidad celular para permitir el progreso de la infección (Chen y col., 2009; Su y col., 2018). Para ello, esta

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

proteína se dirige al núcleo gracias a una secuencia señal rica en argininas, donde activa la expresión de la proteína p53 (Su y col., 2018). El mecanismo de acción de la proteína p53 se basa en la supresión de las ciclinas responsables del progreso del ciclo celular, por lo que se detiene la división y se proporciona un ambiente favorable para la replicación viral (Mai y col., 2018; Su y col., 2018). La parada del ciclo celular en las fases G1, S o G2 es un mecanismo comúnmente observado entre los virus de ARN (Mai y col., 2018). Por otra parte, la proteína B2 se comporta como un antagonista de los mecanismos de defensa celular frente al ARN bicatenal, como el ARNi (ARN interferente) (Ou y col., 2007), permitiendo la acumulación de ARN viral (Ahlquist, 2002; Fenner y col., 2006b; Iwamoto y col., 2005; Su y Hong, 2010).

En la fase de infección tardía, se produce la replicación del ARN2 y la inhibición del ARN3 y se sintetizan las proteínas estructurales necesarias para la producción y ensamblaje de los viriones (Zhong y Rueckert, 1993). La replicación del ARN2 podría activarse mediante la formación de heterodímeros ARN2-ARN3, como se ha descrito en el virus FHV (Eckerle y Ball, 2002; Sommerset y Nerland, 2004). Este virus posee unas secuencias reguladoras en la región no codificante de ambos segmentos genómicos, que actúan en cis regulando la replicación de ambas hebras de ARN (Venter y Shcneemann, 2008). Estas secuencias reguladoras también se pueden encontrar en regiones codificantes (Liu y col., 2009). Además, el inicio de la replicación también se puede producir mediante la interacción de la RdRp con la proteína GRP (del inglés, *glucose-regulated protein*), sintetizada en repuesta a la infección por VNNV (Su y col., 2011).

En esta fase, el genoma viral y las proteínas de la cápside se ensamblan en el citoplasma celular para formar nuevos viriones. La cápside se forma a partir de 180 unidades de la proteína capsidal, que forman 60 subunidades triméricas con un número de triangulación de 3. Durante el ensamblaje viral, el dominio N-terminal de la proteína de la cápside, que contiene un elevado contenido en argininas, es el encargado de captar del genoma viral y neutralizar sus cargas negativas (Lu y Lin y col., 2003; Marshall y Schneemann, 2001; Tan y col., 2001).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

La última etapa de la infección por VNNV es la liberación de la progenie viral al exterior, mediante apoptosis o lisis celular (Chen y col., 2007). Para ello, la proteína B2 regula de forma positiva la expresión del gen *bax* (del inglés *BCL-2 associated X protein*), un gen proapoptótico dentro de la familia de las *Bcl*-2 (Chen y col., 2009; Czabotar y col., 2014; Low y col., 2017; Wu y col., 2008; Zou y col., 2021). La proteína *Bax* induce la pérdida del potencial de membrana mitocondrial (Chen y col., 2009; Czabotar y col., 2014) y forma complejos con la matriz mitocondrial que impiden la entrada de ATP en la mitocondria, desencadenando la muerte celular y necrosis (Fenner y col., 2006b; Mézeth y col., 2009; Sommerset y Nerland, 2004; Su y Hong, 2010). En esta etapa también se producen grandes cantidades de peróxido de hidrógeno, que a su vez activa la síntesis de la proteína relacionada con dinamina (*Drp1*; del inglés *dynamin-related protein* 1) responsable de la fisión de la mitocondria (Chang y col., 2011; Chen y col., 2009; Su y col., 2014). El daño mitocondrial mediado por las proteínas *Bax* y *Drp1*, y que culmina con la apoptosis celular, favorece la dispersión de la progenie viral en la infección por virus no envueltos y con ciclo lítico (Guo y col., 2003; Ou y col., 2007).

Los betanodavirus pueden inducir este proceso de apoptosis no solo mediante el daño mitocondrial, sino también mediante otras dos vías (Costa y Thompson, 2016). Una de ellas es la vía extrínseca o mediada por receptores, que en los betanodavirus es inducida por la proteína de la cápside (Guo y col., 2003). La otra es la ruta mediada por el estrés del retículo endoplasmático, en la que la acumulación de la proteína de la cápside en el citoplasma celular antes del ensamblaje de los viriones favorece la migración del complejo de replicación desde la mitocondria hacia el retículo endoplasmático (Chen y col., 2006; Low y col., 2017).

Todos los eventos celulares descritos anteriormente desencadenan la liberación del citocromo c y otros factores mitocondriales al citoplasma, donde activan la ruta de las caspasas responsables de la muerte celular (Chen y col., 2007; Zhou y col., 2017b).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

II.11. Respuesta inmune del huésped

Tras la entrada del VNNV en el pez se desencadena una respuesta inmune. Aunque es un proceso del que se desconocen bastantes aspectos, el desarrollo de la tecnología de ARN-Seq ha permitido obtener datos transcriptómicos diferenciales para avanzar en su conocimiento (Toubanaki y col., 2022).

Las células del huésped contienen unos receptores de reconocimiento de patrones (PRR, del inglés *pattern recognition receptors*) que reconocen los patrones moleculares asociados a los patógenos (PAMP, del inglés *pathogen associated molecular pattern*) (Costa y Thompson, 2016; Perry y col., 2005). Entre los PRR se encuentran los receptores tipo *toll* (TLR; del inglés, *Toll-Like Receptors*), que transmiten la señal de unión de un patógeno al interior celular regulando la liberación de citoquinas proinflamatorias (Perry y col., 2005). Ejemplo de ello es el receptor TLR-7, descrito en una infección experimental por VNNV en fletán atlántico, que reconoce el ARN monocatenal (Øvergard y col., 2012; Perry y col., 2005).

Tras el reconocimiento de los PAMP y la invasión viral, se desencadena la activación del sistema inmune innato y adaptativo (humoral y celular) (Costa y Thompson, 2016). La primera respuesta ante la invasión del patógeno está mediada por la inmunidad innata, principalmente basada en la acción del interferón y de los genes inducidos por él (ISG; del inglés *interferon-stimulated genes*) (Chen y col., 2014; Perry y col., 2005; Verrier y col., 2011).

El interferón es la principal citoquina secretada por el sistema inmune (Robertsen, 2006), e interfiere con la replicación de los virus dentro de la célula (Huang y col., 2018; Verrier y col., 2011). Aunque en mamíferos se han descrito los tipos I, II y III, en peces solo se han detectado el I y el II (Chen y col., 2014). La expresión del IFN-I (Zou y Secombes, 2011) se ha descrito durante la respuesta inmune innata en lubinas (Scapigliati y col., 2010) y mero (Chen y col., 2014), mientras que el IFN tipo II o γ se expresa durante la respuesta adaptativa y es responsable de la activación de los macrófagos y exhibición del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH). También inhibe la proliferación celular y promueve la apoptosis durante la infección viral en rodaballo (Montes y col., 2010; Overgard y col., 2012;

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Robertsen, 2006; Zou y Secombes, 2011). Ambos tipos de interferón han sido detectados en las líneas celulares ZF-4 (en inglés, *Zebrafish*-4) y BB (en inglés, *brown bullhead*), en respuesta a la infección por VNNV (Chen y col., 2015b; Wu y Chi, 2006).

El interferón tiene una actividad autocrina y paracrina, mediante unión al receptor transmembrana IFNAR (Verrier y col., 2011). Este receptor activa la kinasa de Janus (*Jak1*), que interacciona mediante fosforilación con los transductores y activadores de la señal de transcripción 1 y 2 (*Stat1* y *Stat2*). Estas dos proteínas dimerizan y se unen al factor de regulación de IFN (IRF9), formando el complejo estimulador de los genes de IFN tipo 3 (ISGF3; del inglés, *interferon-stimulated gene factor* 3). El ISGF3 se trasloca al núcleo donde regula la expresión de los ISG (Chen y col., 2014; Verrier y col., 2011), siendo el *mx*, el ISG-1, el IRF1, o el ISG-12 los más estudiados en peces (Montes y col., 2010; Moreno y col., 2018, 2019; Vaz y col., 2022; Verrier y col., 2011).

La proteína *Mx*, inducida por el IFN-I (Zou y Secombes, 2011) interactúa con la polimerasa viral y la redistribuye alrededor del núcleo para su destrucción en lisosomas y fagosomas (Wu y col., 2010a, 2016). Su expresión está inducida de forma diferencial en función del genotipo de betanodavirus causante de la infección y la especie a la que afecta, como se ha visto en lubina, dorada, rodaballo y mero (Montes y col., 2010; Moreno y col., 2018; Poisa-Beiro y col., 2008; Scapigliati y col., 2010). Por ejemplo, la infección en lubina por una cepa SJNNV induce niveles más altos de transcripción del gen *mx* que la RGNNV, a pesar de que esta especie es especialmente susceptible al genotipo RGNNV (Carballo y col., 2016).

Otro de los genes inducidos por el interferón más estudiados es el *isg*-15, responsable del marcaje de proteínas para su degradación enzimática (Campbell y Lenschow, 2013), como se ha descrito durante una infección por VNNV en lenguado, dorada, rodaballo, platija japonesa o la especie *Cynoglossus semilaevis* (Álvarez-Torres y col., 2018; Lin y col., 2015; Moreno y col., 2018; Wang y col., 2012; Yasuike y col., 2011). Dicha degradación ocurre mediante el marcaje de proteínas virales por proteasas como la ubiquitina que, además de regular de forma positiva la síntesis de

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

interferón también inhibe la infección viral por la interacción con la proteína de la cápside (Zhang y col., 2022).

El interferón tipo I también activa componentes clave del sistema inmune innato y adaptativo, como las células presentadoras de antígenos (APC; del inglés, *antigen presenter cells*), los linfocitos T y B, y las células NK (del inglés, *natural killer*) (Chen y col., 2014; Perry y col., 2005).

Los linfocitos T y B pueden neutralizar directamente los virus, mediante interacción con las proteínas de la cápside (Chen y col., 2014; Costa y col., 2007). El contacto con el antígeno favorece la inmunidad humoral y, por tanto, la expresión de la inmunoglobulina M (IgM) (Scapigliati y col., 2010; Wu y col., 2012), mientras que los linfocitos T pueden iniciar un proceso de citotoxicidad en las células infectadas, denominado CMC (del inglés *cell-mediated citotoxicity*) (Chaves-Pozo y col., 2012; Chen y col., 2014).

Por otra parte, la activación de las células NK y los fagocitos por parte del IFN-1 desencadena la expresión del CMH. Así se exponen fragmentos del patógeno en la superficie celular para que sean eliminados por las células NK y fagocitos (Chen y col., 2014).

Otro tipo de respuesta inmune observada en rodaballo es la generación de ROS, como el peróxido de hidrógeno descrito anteriormente, que desencadena la apoptosis mediante el daño producido en las proteínas (Chen y col., 2011b) y también afecta al potencial de membrana mitocondrial (Montes y col., 2010).

La infección por los betanodavirus también se ha relacionado con la síntesis de citoquinas proinflamatorias que forman parte del sistema inmune innato, como el factor de necrosis tumoral α (TNFα) y las interleucinas 1-β (IL-β), IL-1, IL-34, IL-6, e IL-10 (Moreno y col., 2019; Øvergard y col., 2012; Poisa-Beiro y col., 2008,2009; Scapigliati y col., 2010; Vaz y col., 2022; Wu y col., 2019). De hecho, algunos autores sugieren que la vacuolización y neuroinflamación observada en el sistema nervioso de los peces infectados por los betanodavirus podría ser debido a la expresión del TNFα (Poisa-Beiro y col., 2008). Por otra parte, los receptores asociados al TNFα (TRAF, del inglés "*tumor necrosis factor associated-receptor factors*") actúan regulando de forma negativa la respuesta celular antiviral producida por el VNNV (Wu

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

y col., 2022). Este mecanismo contribuye a la evasión del sistema inmune del huésped, permitiendo al VNNV replicar en él y transmitir la progenie, o incluso mantener una infección subclínica. La evasión se produce, entre otros, mediante la interrupción de las respuestas humoral y celular (Vossen y col., 2002). Por otra parte, algunas especies parecen ser resistentes a la infección por determinados genotipos del VNNV, como la dorada, que hasta la fecha sólo se ha demostrado su susceptibilidad a la infección por el recombinante RGNNV/SJNNV (Castric y col., 2001; Toffan y col., 2017) o el rodaballo (Johansen y col., 2004). En esta última especie, solo la infección por el recombinante desencadena signos clínicos, aunque es permisiva para la replicación de los genotipos RGNNV y SJNNV (Olveira y col., 2013; Souto y col., 2016). Hasta la fecha, todavía se desconoce si el sistema inmune estaría implicado en la resistencia y/o susceptibilidad ante determinadas cepas o genotipos, o si este fenómeno se debiese a cambios en la región de la proteína de la cápside que interactúa con las células del huésped (Souto y col., 2015b).

Finalmente, la respuesta inmune también podría contribuir al desarrollo de signos clínicos y la mortalidad. La infección en lenguados y doradas con un virus atenuado promueve la expresión de un número inferior de genes relacionados con la respuesta inmune, que la infección con la cepa salvaje (Labella y col., 2018; Moreno y col., 2019). También se ha comprobado en cultivos primarios de tejido cerebral de mero, que la infección por VNNV activa la proliferación de células de la microglía y la secreción de citoquinas responsables de muerte neuronal, explicando así la sintomatología observada (Chiang y col., 2017).

II.12. Diagnóstico del VNNV

II.12.1. Técnicas histológicas

Los primeros diagnósticos realizados en peces con signos de ERV se hicieron mediante análisis macroscópicos e histopatológicos, ya que todavía no se había conseguido aislar el virus en cultivo celular. Las lesiones observadas incluían principalmente la vacuolización del cerebro y retina, una hinchazón en la vejiga natatoria y hemorragias en el tejido cerebral (Glazebrook y Campbell, 1987; Glazebrook y col., 1990; Mori y col., 1991; Yoshikoshi e Inoue, 1990).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Sin embargo, en la actualidad las técnicas histológicas no están aceptadas para el diagnóstico del VNNV, ya que proporcionan un diagnóstico presuntivo, a menos que se complementen con el aislamiento en cultivo celular e identificación del agente mediante técnicas serológicas o moleculares (Toffan y Panzarin, 2020).

II.12.2. Técnicas celulares

Las técnicas celulares permiten el aislamiento del agente causal de la patología. Para el aislamiento de los betanodavirus, la OIE recomienda el uso de dos líneas celulares de cultivo continuo (OIE, 2019). La primera de ellas es la línea SSN-1, derivada de *striped snakehead* (*Channa striatus*) e infectada de forma permanente por el retrovirus *Snakehead retrovirus* (SnRV) (Iwamoto y col., 2000) y que se utilizó para el primer aislamiento de este virus (Frerichs y col., 1996). El efecto citopático (ECP) provocado por la infección del VNNV incluye la visualización de células redondeadas y con vacuolas en el citoplasma, con aspecto refractario. En un período de 3-4 días, este efecto se extiende por todo el tapiz, provocando la destrucción por completo de la monocapa.

La otra línea celular que mantiene la permisividad para el VNNV y permite su aislamiento es la E-11, un clon de la línea SSN-1 (Iwamoto y col., 2000). La infección en esta línea celular también induce una extensa vacuolización citoplasmática seguida de la desintegración de la monocapa, como se muestra en la **Figura 2** (Iwamoto y col., 2000; Lee y col., 2002). El retrovirus SnRV también está presente en esta línea celular, por lo que algunos autores han hipotetizado sobre su papel en la susceptibilidad al VNNV (Lee y col., 2002: Nishizawa y col., 2008).

Ninguna de estas líneas celulares tiene origen nervioso, por lo que no permiten un estudio adecuado de la interacción del virus con los receptores de las células nerviosas de los peces. Sin embargo, se ha establecido recientemente un protocolo para el cultivo primario de neuronas de lenguado (Souto y col., 2018c), que permitirá profundizar en el conocimiento de esta interacción.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

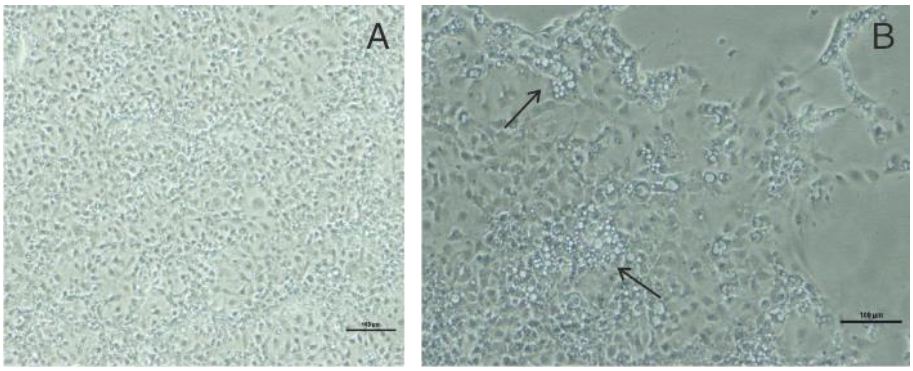


Figura 2. Evolución de la infección por VNNV en la línea celular E-11. **(A)** Monocapa confluente en el momento de la inoculación y **(B)** efecto citopático (ECP) detectado tras 4 días de la inoculación. Las flechas indican la formación de vacuolas en el tapiz. Escala 100 µm.

También se han descrito otras líneas celulares susceptibles a la infección por betanodavirus, derivadas de un gran número de especies (**Tabla 5**). Conviene destacar las líneas SAF-1 y SaB-1, obtenidas de aleta y cerebro de dorada, respectivamente, ya que son permisivas a la replicación del VNNV, aunque carecen de retrovirus (Bandín y col., 2006; Valero y col., 2021a). Sin embargo, las líneas celulares de peces RTG-2 (del inglés, *rainbow trout gonad*-2), EPC (del inglés, *epitelioma papulosum cyprini*), FHM (del inglés, *fathead minnow*) o CHSE-214 (del inglés, *Chinook salmon embryo*) parecen no ser susceptibles (Breuil y col., 1991; Fukuda y col., 1996; Mori y col., 1992; Munday y col., 1992).

Tabla 5. Lista de líneas celulares susceptibles a la infección por VNNV.

Línea	Nombre	Especie	Tejido
BB	*Brown Bullhead*	*Lates calcarifer*	Cerebro[1]
BF-2	*Bluegill fry-2*	*Lepomis macrochirus*	Alevines[1]
BMGB	*Brown marbeled grouper brain*	*E. fuscoguttatus*	Cerebro[2]
CPB	*Chinese Perch Brain*	*Siniperca chuatsi*	Cerebro[3]
DLB-1	*Dicentrarchus labrax brain-1*	*Dicentrarchus labrax*	Cerebro[4]
E-11	-	*Ophicephalus striatus*	Alevines[5]
ELGSN	*Epinephelus lanceolatus grouper snout*	*Epinephelus lanceolatus*	Hocico[6]
EMB	*E. moara brain*	*Epinephelus moara*	Cerebro[7]
GB	*Grouper brain*	*Epinephelus awoara*	Cerebro[8]
GBC1; GB11	*Grouper brain*	*Epinephelus coioides*	Cerebro[9]
GF-1	*Grouper fin-1*	*Epinephelus coioides*	Aleta[10]
JFSK	*Japanese flounder skin*	*Paralichthys olivaceus*	Piel[11]

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Línea	Nombre	Especie	Tejido
LJB	*Lateolabrax japonicus brain*	*Lateolabrax japonicus*	Cerebro[12]
OLHNI	*Oryzias latipes HNI*	*Oryzias latipes*	Aleta[13]
SaB-1	*Sparus aurata brain-1*	*Sparus aurata*	Cerebro[14]
SAF-1	*Sparus aurata fin-1*	*Sparus aurata*	Aleta[15]
SB	*Seabass*	*Lates calcarifer*	Alevines[16]
SBL	*Seabass larvae*	*Dicentrarchus labrax*	Larva[17]
SIGE	*Sahul Indian Grouper Eye*	*Epinephelus coioides*	Ojos[18,19]
SISK	*Sahul Indian Seabass Kidney*	*Lates calcarifer*	Riñón[19,20]
SISS	*Sahul Indian Seabass Spleen*	*Lates calcarifer*	Bazo[19,21]
SPE	*Snubnose pompano gill*	*Trachinotus blochii*	Ojo[22]
SPF	*Snubnose pompano gill*	*Trachinotus blochii*	Aleta[22]
SPG	*Snubnose pompano gill*	*Trachinotus blochii*	Branquia[22]
SPH	*Snubnose pompano gill*	*Trachinotus blochii*	Corazón[22]
SPK	*Snubnose pompano gill*	*Trachinotus blochii*	Riñón[22]
SSN-1	*Snakehead-fish*	*Ophicephalus striatus*	Alevines[23]
TOGB	*Trachinotus ovatus brain*	*Trachinotus ovatus*	Cerebro[24]
TOHK; TOK	*Trachinous ovatus head kidney*	*Trachinotus ovatus*	Riñón anterior[25,26]

(1)Wolf y col. J Inf Dis **1968**, 118, 3, 253-262. (2)Wen. J Fish Diseases **2016**, 39, 11, 1335-1346. (3)Tu y col. Int J Mol Sci **2016**, 17, 740. (4)Morcillo y col. Toxicol in Vitro **2017**, 38, 91-100. (5)Iwamoto y col. Dis Aquatic Org **2000**, 43, 2, 81-89. (6)Huang y col. Aquaculture **2014**, 432, 265-272. (7)Liu y col. J Fish Biol 2018, 92, 2, 298-307. (8)Lai y col. J Fish Dis **2001**, 24, 5, 299-309. (9)Ma y col. Aquaculture **2010**, 511, 734211. (10)Chi y col. J Fish Dis **1999**, 22, 3, 173-182. (11)Wang y col. Fish Physiol Biochem **2017**, 43, 6, 1477-1486. (12)Le y col. In Vitro Cell Dev Biol Animal **2017**, 53, 9, 834-840. (13)Adachi y col. Virol J 2010, 7, 150. (14)Ruiz-Palacios y col. Fish Shell Immunol **2020**, 106, 161-166. (15)Bejar y col. Aquaculture **1997**, 150, 143-153. (16)Chang y col. Aquaculture **2001**, 192, 133-145. (17)Delsert y col. J Virol **1997**, 71, 5673-5677. (18)Parameswaran y col. Marin Biotech **2007**, 2, 281-291. (19)Babu y col. Arch Virol **2013**, 158, 6, 1367-1375. (20)Hameed y col. Aquaculture **2006**, 257, 92-103. (21)Parameswaran y col. Aquaculture **2006**, 261, 45-53. (22)Abdul y col. J Fish Dis **2022**, 45, 121-139. (23)Frerichs y col. J Gen Virol, **1991**, 72, 2537-2539. (24)Ransangan y col. Aquaculture **2011**, 315, 327-334. (25)Li y col. J Fish Biol **2017**, 90, 1944-1959. (26)Zhou y col. J Fish Dis **2017**, 40, 1831-1838.

II.12.3. Técnicas serológicas

Las técnicas de serología recomendadas por la OIE para el diagnóstico del VNNV son la inmunofluorescencia (IFA), el ELISA (ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas; del inglés *enzyme-linked immunosorbent assay*), la tinción inmunohistoquímica (IHC) y la seroneutralización. Estas técnicas se fundamentan en el uso de anticuerpos mono y policlonales para el reconocimiento de los antígenos virales (Toffan y Panzarin, 2020).

La IFA permite la detección del agente causal de la patología, y se realiza directamente sobre cortes histológicos de tejidos nerviosos o del tapiz celular. Esta técnica ya se incluía en las primeras publicaciones sobre diagnóstico de VNNV, y que mostraban la localización de las partículas virales en el cerebro

USC UNIVERSIDADE SANTIAGO DE COMPOSTELA

y ojos de los peces infectados (Curtis y col., 2001; Nguyen y col., 1997; Totland y col., 1999).

El ELISA y sus variantes (indirecto, de captura, ELASA…) se utiliza tanto para la detección de antígenos virales como de anticuerpos específicos contra el VNNV, pero presenta una baja reproducibilidad (Fenner y col., 2006a; Gye y Nishizawa, 2018; Makesh y col., 2022; Nuñez-Ortiz y col., 2016a; Toffan y Panzarin, 2020; Zhou y col., 2017a). Se utiliza comúnmente en cribados poblaciones para la detección de individuos portadores (Breuil y col., 1999, 2001; Watanabe y col., 2000), utilizando muestras de sangre, huevos, larvas y órganos reproductores (Arimoto y col., 1992; Grove y col., 2006; Scapigliati y col., 2010; Tarrab y col., 2019). Sin embargo, se aconseja que el resultado positivo de esta prueba sea confirmado mediante cultivo celular o técnicas moleculares (Huang y col., 2001; Shieh y Chi, 2005).

La tinción inmunohistoquímica (IHC) proporciona datos de localización de los antígenos virales a nivel anatómico (Johansen y col., 2004). Esta técnica complementa la información de los casos clínicos ya que permite observar el avance de la necrosis del sistema nervioso o en las diferentes capas la retina (Boukedjouta y col., 2020; Breuil y col., 2001; Buonocore y col., 2019; Grotmol y col., 1997; Johansen y col., 2004; Keawcharoen y col., 2015; Mladineo, 2003; OIE, 2019; Pascoli y col., 2016; Toffan y Panzarin, 2020).

Por último, la seroneutralización también se ha utilizado en la identificación del VNNV (Mori y col., 2003), y para evaluar la respuesta inmune humoral de un organismo ante la infección (Kai y col., 2010; Skliris y Richards, 1999; Tanaka y col., 2001).

II.12.4. Técnicas moleculares

Las técnicas moleculares son más sensibles, específicas y rápidas que las técnicas comentadas anteriormente, si bien tienen un coste económico superior.

Los métodos moleculares aprobados para el diagnóstico de VNNV incluyen varias técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), como la transcripción inversa-PCR (RT-PCR), nested RT-PCR o RT-PCR anidada

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

(nRT-PCR), RT- PCR cuantitativa (RT-qPCR) y técnicas de amplificación isotérmica (Toffan y Panzarin, 2020).

La RT-PCR convencional se usa comúnmente con fines científicos y de diagnóstico. Se utiliza la pareja de cebadores F2-R3, recomendada por la OIE, que amplifican la región T4 del ARN2 (Nishizawa y col., 1994), pero poseen limitaciones de especificidad y sensibilidad debido a la heterogeneidad en la secuencia de esta región, dando lugar falsos negativos (OIE, 2019; Toffan y Panzarin, 2020). Así algunos autores como Dalla Valle y col. (2000), Grotmol y col. (2000) o Thiery y col. (1999), proponen el uso de cebadores alternativos con mayor especificidad y sensibilidad. La combinación de la RT-PCR convencional con técnicas de hibridación incrementa la sensibilidad del protocolo, y permite la diferenciación entre genotipos y la detección de portadores (Lopez-Jimena y col., 2010).

El protocolo de nRT-PCR fue desarrollado por Thièry y col. (1999) para una detección más eficiente de los betanodavirus ya que presenta una mayor sensibilidad (en torno a 100 veces superior), especificidad y seguridad que la RT-PCR (Olveira y col., 2008). También se ha utilizado para la selección de reproductores libres de VNNV, mediante técnicas no invasivas como el análisis de sangre (Dalla Valle y col., 2000; Gagné y col., 2004; Gomez y col., 2004, Olveira y col 2008).

La PCR en tiempo real (RT-qPCR) es una técnica rápida y de elevada sensibilidad, que permite detectar y diferenciar los 4 genotipos y los recombinantes, así como cuantificar de forma exacta la cantidad de genoma viral presente en una muestra (Baud y col., 2015; Dalla Valle y col., 2000; Grove y col., 2006; Hick y Whittington, 2010; Hodneland y col., 2011; Olveira y col., 2021; Panzarin y col., 2010). Según la OIE, la RT-qPCR es la técnica de diagnóstico de preferencia frente a la RT-PCR convencional o la nRT-PCR en términos de sensibilidad y especificidad (Toffan y Panzarin, 2020). Se ha validado una modificación de esta técnica, denominada TaqMan qPCR, que incorpora el uso de sondas para la detección específica de los cuatro genotipos de forma eficaz ante concentraciones muy bajas del virus (Baud y col., 2015; Panzarin y col., 2010). También se ha desarrollado una técnica de PCR que permite una rápida visualización del resultado de la RT-

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

PCR, basado en un biosensor de flujo lateral (LFB, del inglés *lateral flow biosensor*) con anticuerpos policlonales conjugados con nanopartículas de oro, que permite la detección rápida del virión completo del VNNV (Toubanaki y col., 2015, 2020; Toubanaki y Karagouni, 2020).

La RT-qPCR también se ha combinado con desnaturalización de alta resolución (HRM, del inglés, *high resolution melting*), que combina 4 parejas de cebadores en una misma reacción para detectar de forma simultánea los 4 genotipos, en base a la diferente temperatura de desnaturalización (Senapin y col., 2010; Toubanaki y Karagouni, 2017).

En cuanto a las técnicas de amplificación isotérmica, también proporcionan buenos datos de sensibilidad y especificidad, y permiten la amplificación del genoma viral sin necesidad de un equipo especial. Entre ellos se encuentra la metodología NASBA (del inglés, *real-time nucleic-acid-sequence-based amplification*), que sigue una amplificación basada en la secuenciación en tiempo real (Starkey y col., 2004), la técnica LAMP (del inglés, *Loop-mediated associated amplification*), en la cual la amplificación isotérmica es mediada por bucles (Hwang y col., 2016; Mekata y col., 2015; Xu y col., 2010b) y la técnica CPA-LFD (del inglés, *cross-priming isothermal amplification coupled with lateral flow dipstick*), que acopla una varilla de flujo lateral a la amplificación isotérmica con cebadores cruzados (Su y col., 2015).

Por último, también se puede utilizar la secuenciación para caracterizar nuevas cepas de betanodavirus e identificar fenómenos de recombinación (Toffan y Panzarin, 2020).

A pesar de la variedad de técnicas moleculares descritas para el diagnóstico del VNNV, la OIE recomienda el uso de RT-qPCR debido a su elevada sensibilidad y especificidad, junto con la detección del agente viral en cultivo celular.

II.12.5. Técnicas de microscopía

Las técnicas de microscopía electrónica permiten diferenciar viriones en el interior del citoplasma celular, tanto libres como asociados a la membrana del retículo endoplasmático (Azad y col., 2006b; Breuil y col., 1991; Frerichs

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

y col., 1996; Glazebrook y col., 1990; Mori y col., 1992). Sin embargo, esta técnica no es apropiada para el diagnóstico ya que depende de una elevada concentración de virus, lo que reduce considerablemente su sensibilidad.

II.13. Mecanismos de prevención y control

Hasta la fecha, no se han aprobado tratamientos efectivos frente a la encefalopatía y retinopatía viral, por lo que muchos de los esfuerzos se han centrado en establecer y desarrollar estrategias de prevención que eviten la entrada del patógeno en una explotación y las consecuencias devastadoras sobre la producción. En caso de introducción del VNNV en un lote de peces, la primera medida incluye la destrucción del lote afectado para evitar la propagación del virus, seguido de la aplicación de unos protocolos de desinfección muy estrictos y el control periódico de otros grupos de peces, con la consecuente limitación en la producción. En el caso de que el VNNV afecte a grupos de peces en estados larvarios, además de las consecuencias comentadas anteriormente, también pondría en compromiso la viabilidad de la producción.

Los métodos profilácticos adoptados en las plantas de cultivo han sido establecidos considerando cada una de las zonas de la planta, diferenciando entre las zonas de reproductores, de cría, y las zonas de engorde. En primer lugar, una planta de acuicultura debe contar con estrictos programas de vigilancia de los reproductores para asegurar que se mantienen libres de virus y la viabilidad y seguridad de la puesta (Bandín y Souto, 2020). Para ello se utilizan métodos no destructivos, como el análisis de sangre, esperma o tejido ovárico mediante RT-qPCR (Dalla Valle y col., 2000; Olveira y col., 2008, 2021; Valero y col., 2015). En caso de que algún reproductor resulte positivo, ha de ser eliminado de forma inmediata.

Por otra parte, es importante asegurar que los proveedores de huevos y larvas son de confianza y presentan certificados del buen estado de los lotes, y establecer áreas de cuarentena en las que mantener a los nuevos individuos. Para el mantenimiento de estos estados larvarios resulta indispensable el uso de fito y zooplancton con certificación VNNV-*free*, así como la separación de los lotes de larvas para evitar la posible diseminación del patógeno.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Finalmente, las plantas de acuicultura tienen que asegurar una buena calidad del suministro de agua, y contar con personal formado correctamente en protocolos de bioseguridad (Padrós y col., 2022).

Aunque, como ya se ha comentado, no hay aprobados tratamientos eficaces frente al VNNV, se han estudiado algunas sustancias de diferente origen con actividad frente al virus. Entre ellos se incluyen sustancias producidas por las bacterias *Aeromonas* spp. y *Shewanella* spp (Chen y col., 2014), el péptido antimicrobiano "hepcidina 1-5" de tilapia, la "epinecidina-1" de mero o un factor antilipopolisacárido cíclico de crustáceos (Chia y col., 2010; Wang y col., 2010). Asimismo, las algas son fuente de compuestos naturales con actividad antiviral o virucida, como el inhibidor del citocromo P450 que inhibe la fase de replicación del VNNV (Huan y Han, 2014).

Algunos antivirales comerciales como la ribavirina o la amantadina, utilizados en medicina humana, también inhiben la replicación del virus y/o potencian la respuesta inmune (Morick y Saragovi, 2017; Zhu y col., 2022). El mecanismo de acción de algunos de estos compuestos, como el cloruro de amonio, el cloruro de clorpromazina y la cloroquina, se basa en la inhibición la endocitosis mediada por clatrina o en la prevención de la liberación del VNNV del interior de los endosomas (Adachi y col., 2007; Sushila y col., 2018).

También el uso de probióticos y/o inmunoestimulantes, como los β-glucanos, contribuye a prevenir la infección por VNNV (Krishnan y col., 2022).

II.13.1. Vacunas

La vacunación es un método profiláctico prometedor, especialmente en los reproductores, para evitar la transmisión del VNNV a la progenie (Lu y col., 2020; Yang y col., 2022). La mayoría de los ensayos de desarrollo de vacunas se han dirigido al genotipo RGNNV ya que es el detectado con mayor frecuencia.

Las técnicas de producción de vacunas incluyen metodologías muy diversas, incluyendo la inactivación y atenuación del virus, el desarrollo de partículas virus-*like* (VLP), proteínas recombinantes de la cápside o péptidos sintéticos, y las vacunas de ADN (Gomez-Casado y col., 2011) (**Tabla 6**).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 6. Tipos de vacunas desarrolladas para el VNNV.

Tipo / Genotipo	Especie	Método	RPS*
Inactivadas: Etilenimina Binaria (BEI)			
HGNNV[1]	Mero de manchas naranjas	Baño	79 %
HGNNV[2]	Mero de manchas naranja	Baño / Oral	87 %
HGNNV[3]	Mero lanceolado	IP	67 %
RGNNV/SJNNV[4]	Lenguado senegalés	IP	51 %
Inactivadas: Formalina			
HGNNV[1]	Mero de manchas naranjas	Baño	39 %
RGNNV[5]	Mero carcelario	IP / IM	60 %
SGWak97[6,7]	Mero manchado	IP	60 %
RGNNV[8]	Lubina	IP	85 %
SJNNV[8]	Lubina	IP	25 %
RGNNV[9]	Lubina	IP	100 %
RGNNV/SJNNV[4]	Lenguado senegalés	IP	43 %
Inactivadas: Calor			
S1 / Sb2[10]	Lubina	IM	26 – 33 %
RGNNV[11]	Esturión	Baño / IP	-
Partículas virus-like (VLP)			
MGNNV[12]	Lubina	IM	70 %
GNNV[13]	Mero lanceolado y malabar	IM	-
OGNNV[14]	Mero de manchas naranjas	IM	-
RGNNV[15]	Mero carcelario	IP / Oral	100 / 57 %
OGNNV[16]	Mero de manchas naranjas	IM	-
RGNNV[17]	-	-	-
RGNNV[18]	Lubina	IM	67 - 73 %
RGNNV[19]	Lubina	IP	87 %
RGNNV[20]	Mero carcelario	IP / Oral	90 / 72 %
Recombinantes			
r-FNCP42[21,22]	Perca gigante	Oral	60 %
CP-RGNNV[23]	Mero jorobado	IM	67 %
recAHNNV-C[24]	Rodaballo	IP	29 %
rT2 SJNNV[25]	Rodaballo	IP	33 %
RGNNV-CP[26]	-	Oral	-
pET24a CP[27]	Mero	Oral	64 - 69 %
MrNV dsARN[28]	Langostino de Malasia	Oral	75 – 80 %
MrNV CP[29]	Langostino de Malasia	Baño / IM	-
rNNV-CP[30]	Mero carcelario	IM	90 %
GNNV[31]	Mero lanceolado	IP	66 %
rCoat[32]	Mero carcelario	Oral	-
rNNV[33]	Lubina	Oral / IP	100 %
VNNV-C [NP 34]	Lenguado	Oral / IP	70 %
Péptidos sintéticos			
N-ter DIEV ARN2[10]	Lubina	IM	27 %
Vacunas ADN			
r-FNCP42-ADN[22]	Perca gigante	IM	77 %
pAHNNV C[24]	Rodaballo	IM	67 %

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tipo / Genotipo	Especie	Método	RPS*
pcMGNNV2[35]	Mero de manchas naranjas	IM	71 %
XSVAS[36]	Langostino de Malasia	Baño / Oral	50 %
CP-pNNV[37]	Lubina	Oral	45 %
Vivas			
RGNNV[38]	Mero carcelario	Baño	100 %

(1)Kai y Chi. Vaccine **2008**, 26, 1450-1457. (2)Kai y col. Fish Shell Immunol **2014**, 40, 563-569. (3)Chen y col. J Fish Dis **2017**, 40, 1-8. (4)Valero y col. Pathogens 2021, 10, 1565-1579. (5)Yamashita y col. J Fish Dis **2009**, 32, 767-775. (6)Pakingking y col. J Fish Dis **2009**, 32, 457-463. (7)Pakingking y col. Fish Shell Immunol **2010**, 28, 525-533. (8)Pascoli y col. Fish Shell Immunol **2019**, 85, 85-89. (9)Falco y col. Vaccines **2021**, 9, 1-17. (10)Coeurdacier y col. Fish Shell Immunol **2003**, 14, 435-447. (11)Afsharipour y col. Fish Shell Immunol **2021**, 116, 91-97. (12)Thiéry y col. J Virol **2006**, 80, 10201-10207. (13)Liu y col. Vaccine **2006**, 24, 6282-6287. (14)Lai y col. Vet Immunol Immunop **2014**, 157, 87-96. (15)Wi y col. Vet Microbiol **2015**, 177, 214-218. (16)Lin y col. Fish Shell Immunol **2016**, 56, 136-143. (17)Lan y col. Biologicals **2018**, 51, 25-31. (18)Barsøe y col. Vaccines **2021**, 9, 1-22. (19)Barsøe y col. Pathogens **2021**, 10, 1477-1503. (20)Nakahira y col. Front Plant Sci **2021**, 12,717952. (21)Vimal y col. Aquaculture 2014, 420, 240-246. (22)Vimal y col. Aquac Res **2016**, 47, 109-1220. (23)Yuasa y col. J Fish Dis **2002**, 21, 53-56. (24)Sommerset y col. Fish Shell Immunol **2005**, 18, 13-29. (25)Húsgard y col. Dis Aquat Org **2001**, 45, 33-44. (26)Kim y col. Lett App Microbiol **2014**, 58, 285-291. (27)Lin y col. Aquaculture **2007**, 268, 265-273. (28)Naveen Kumar y col. Fish Shell Immunol **2013**, 35, 833-839. (29)Farook y col. J Fish Dis **2014**, 37, 703-710. (30)Kim y col. J Microbiol Biotechnol **2015**, 25, 1761-1767. (31)Lin y col. Fish Shellfish Immunol **2018**, 74, 551-558. (32)Cho y col. J Vet Med Sci **2018**, 80, 272-279. (33)Gonzalez-Silvera y col. Fish Shellfish Immunol **2019**, 88, 458-463. (34)Thwaite y col. Fish Shellfish Immunol **2020**, 99, 578-586. (35)Chen y col. Fish Shellfish Immunol **2015**, 45, 919-926. (36)Ramya y col. J Fish Dis **2014**, 37, 815-824. (37)Valero y col. Dev Comp Immunol **2016**, 65, 64-72. (38)Kim y col. Virus Res **2021**, 292, 198227.

La técnica de preferencia utilizada en la producción de la mayor parte de las vacunas contra los betanodavirus, incluidas las comerciales, es la inactivación con formalina, ya que proporcionan una respuesta inmune duradera, rápida y efectiva, y mantiene el antígeno intacto para ser reconocido por el sistema inmune (Brudeseth y col., 2013, Falco y col., 2021; Pakingking y col., 2010, 2018; Yamashita y col., 2005, 2009). La inactivación del VNNV también se puede realizar mediante calor (Nuñez-Ortiz y col., 2016b), luz ultravioleta (Valero y col., 2018) u otros compuestos como la etilenimina binaria (Cheng y col., 2017; Kai y col., 2010; Valero y col., 2021b) o la β-propiolactona (Nuñez-Ortiz y col., 2016b).

A nivel experimental también se han realizado ensayos de inmunización con partículas virus-*like* que proporcionan una fuerte respuesta humoral (Barsøe y col., 2021; Lai y col., 2014; Lin y col., 2016; Liu y col., 2006; Thiery y col., 2006).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Otra aproximación es la utilización de vacunas de subunidades recombinantes, en las que el inmunógeno se produce en matrices de epitopos lineales (LME; del inglés *linear matrix epitope*) que contienen secuencias en tándem de la proteína de la cápside (Lin y col., 2018), utilizando vectores de expresión como la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Cho y col., 2017), la bacteria *E. coli* (Gonzalez-Silvera y col., 2019; Husgard y col., 2001; Lin y col., 2007; Sommerset y col., 2005; Tanaka y col., 2001), o los cloroplastos de la planta del tabaco (Cho y col., 2018). Este tipo de vacunas, formadas por componentes purificados del virus, se consideran un método seguro para la inmunización de los peces (Liu y col., 2006; Sommerset y col., 2005). Se ha visto que la inmunización con la proteína recombinante de la cápside produce unos niveles elevados de anticuerpos neutralizantes (Sommerset y col., 2005) y que una vacuna de subunidades combinada con *Vibrio anguillarum* induce altos niveles de protección en larvas (Chen y col., 2011a; Lin y col., 2007).

En cuanto a las vacunas de ADN, se han ensayado en numerosas especies, pero los niveles de protección varían entre ellas, así como el tipo de respuesta inmune inducida (Chen y col., 2015b; Sommerset y col., 2005; Valero y col., 2016; Vimal y col., 2014, 2016).

Por último, se han desarrollado protocolos de vacunación utilizando el virus vivo, pero a una temperatura subóptima que limita su capacidad de replicación (Kim y col., 2021c; Nishizawa y col., 2012; Oh y col., 2013). Entre las vacunas vivas se encuentran también las de virus atenuados. La investigación sobre posibles determinantes de virulencia, como los aminoácidos 247 y 270 de la proteína de la cápside, resulta útil a la hora de diseñar virus atenuados que puedan inmunizar a la población frente al VNNV, así como replicar y transmitirse de forma horizontal y vertical entre individuos.

A pesar de las múltiples ventajas de la vacunación de los peces, las vías de inmunización son uno de los factores que limitan su aplicación. Las tres formas más comunes de inmunización son la vacunación mediante inmersión, inyección y la vía oral, y cada uno de ellos presenta ventajas e inconvenientes.

La inyección intramuscular (IM) o intraperitoneal (IP) se utiliza comúnmente con vacunas inactivadas, de subunidades recombinantes y de

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ADN que puede combinarse con adyuvantes oleosos o acuosos que potencian la respuesta inmunitaria (Bandín y Souto, 2020; Chen y col., 2014; Hazreen-Nita y col., 2019). Sin embargo, es un proceso muy laborioso si se debe aplicar a un elevado número de individuos y tiene serias limitaciones para vacunar peces de pequeño tamaño. Por otra parte, la inmunización por baño permite la vacunación de un gran número de peces sin límite inferior de tamaño, y es un método adecuado para las vacunas vivas e inactivadas, aunque en muchos casos no induce una protección duradera. Por último, la inmunización vía oral permite la introducción de forma directa del antígeno mediante el tracto digestivo del pez, utilizando la encapsulación en el pienso. Este método destaca porque no induce ningún tipo de estrés en los individuos, y permite la vacunación de un gran número de peces con poco esfuerzo, independientemente del tamaño de los individuos (Bandín y Souto, 2020; Hazreen-Nita y col., 2019; Kai y Chi, 2008). Sin embargo, las limitaciones de esta técnica son los problemas de palatabilidad a la hora de incorporar el antígeno en el pienso, y que éste debe ir adecuadamente protegido de la degradación por los ácidos gástricos (Hazreen-Nita y col., 2019). Una vía prometedora para la inmunización oral es el uso del alimento vivo (rotíferos o *Artemia*) que se proporciona a los estados de desarrollo temprano de los peces marinos. Este método ya ha sido probado en alevines de mero utilizando *Artemia* enriquecida con *E. coli* que expresa la proteína recombinante de la cápside de betanodavirus, y que proporcionó una respuesta inmune efectiva (Lin y col., 2007). Conviene destacar también que, aunque la vacunación vía oral o por baño permite inmunizar peces de cualquier talla, se debe tener en cuenta el grado de desarrollo del sistema inmune que, en estados larvarios, especialmente afectados por el VNNV, todavía está inmaduro.

El mecanismo ideal de vacunación sería la inmunización de los reproductores para prevenir la transmisión vertical hacia la descendencia. Aunque hay algunos ensayos a nivel experimental (Kai y col., 2010; Pakingking y col., 2018), todavía no hay datos que permitan la vacunación a gran escala de los reproductores de las especies afectadas por la patología.

En la actualidad, únicamente están autorizadas dos vacunas frente al genotipo RGNNV que se administran por inyección, basadas en la inactivación mediante formalina. Se comercializan en el área mediterránea

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

para la vacunación de lubinas, bajo el nombre de *Alpha ject micro ® 1Noda* (Pharmaq) e *Icthiovac ® NNV* (Hipra). Son muchos los esfuerzos realizados a nivel mundial por investigadores de diferentes ámbitos para desarrollar una vacuna eficaz que pueda ser comercializada. Sin embargo, otro de los problemas que se han encontrado es la especificidad de huésped que presenta cada variante y las dificultades para inmunizar estados de desarrollo tempranos como alevines o juveniles, que son los más susceptibles a la infección por VNNV. La vacuna *Alpha jet micro* ®1 *Noda* está recomendada para peces con un peso mínimo de 12 g, que, en el caso de muchas especies de peces, son poco susceptibles a la infección viral.

Por lo tanto, dado que la vacunación no es, de momento, una herramienta eficaz para la prevención de la ERV, se evidencia la necesidad de profundizar en el conocimiento de las vías de transmisión del VNNV y la interacción con diferentes huéspedes, así como su estabilidad ante condiciones ambientales diversas, con el fin de contribuir al desarrollo de estrategias de prevención y control que eviten o minimicen su entrada en las instalaciones acuícolas. Así pues, este será el hilo conductor de esta tesis doctoral.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

OBJETIVOS

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

OBJETIVOS

Los principales objetivos de esta tesis doctoral son los siguientes:

1. Determinar la prevalencia de los betanodavirus en poblaciones naturales de peces de la costa atlántica de Galicia.
2. Determinar el papel de los invertebrados utilizados como alimento vivo en la transmisión de los betanodavirus a las larvas de peces marinos.
3. Evaluar el efecto de las condiciones de cultivo de los peces sobre la replicación viral.
4. Evaluar la estabilidad de los betanodavirus en agua de mar.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

AIMS

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

AIMS

The main objectives of this doctoral thesis are the following:

1. Determine betanodavirus prevalence in wild fish populations along the Atlantic coast of Galicia.
2. Determine the role of invertebrates used as live food in betanodavirus transmission to marine fish larvae.
3. Assess the effect of fish rearing conditions on viral replication.
4. Evaluate betanodavirus stability in sea water.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

CAPÍTULO I. ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO DE LA PREVALENCIA DEL VNNV EN BANCOS NATURALES DE PECES EN EL OCÉANO ATLÁNTICO

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

CAPÍTULO I. ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO DE LA PREVALENCIA DEL VNNV EN BANCOS NATURALES DE PECES EN EL OCÉANO ATLÁNTICO

1.1. Introducción

Las cepas de VNNV detectadas en Europa hasta el año 2007 pertenecían a los genotipos RGNNV y BFNNV, siendo el primero de ellos el más abundante (Bandín y Souto, 2020). Sin embargo, en ese año, Cutrín y col. (2007) describieron por primera vez cepas con ARN2 tipo SJNNV en la Península Ibérica, que formaban un clado diferenciado de las cepas descritas en aguas de Japón. Tras el descubrimiento de la existencia de recombinación natural entre los dos segmentos genómicos del virus (Toffolo y col., 2007), la mayoría de estas cepas fueron reclasificadas como recombinantes RGNNV/SJNNV (Olveira y col., 2009). En los últimos años, se han detectado nuevas cepas recombinantes en el Sur de Europa, tanto en el medio natural como asociadas a episodios de ERV en peces cultivados (Bitchava y col., 2019; Panzarin y col., 2012; Toffan y col., 2017).

Desde los años 2000, un gran número de estudios epidemiológicos realizados para conocer la prevalencia del VNNV, han detectado dicho patógeno en diferentes especies de vertebrados e invertebrados marinos. La mayoría de ellos se llevaron a cabo en el área Mediterránea (Bitchava y col., 2019; Errani y col., 2021; Johnstone y col., 2022; Panzarin y col., 2012; Toffolo y col., 2007; Volpe y col., 2018), y en menor medida, en aguas costeras de países nórdicos como Suecia y Noruega (Korsnes y col., 2017; Nylund y col., 2008), y en países asiáticos (Baeck y col., 2007; Banu y col., 2019; Gomez y col., 2006, 2008b; Kim y col., 2018b). Estos estudios no solo

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

permiten determinar la prevalencia del VNNV en un área determinada, sino también estudiar la diversidad genética de los nuevos aislados y definir posibles determinantes de virulencia, para prevenir, en la medida de lo posible, los brotes de ERV. Por tanto, el objetivo de este capítulo es analizar la prevalencia del VNNV en peces salvajes capturados en el Océano Atlántico, una de las áreas principales para la pesca extractiva de la flota europea.

1.2. Material y métodos

1.2.1. Muestreo de peces

Este estudio se llevó a cabo sobre un total de 1277 peces pertenecientes a 16 especies, recogidas en la **Tabla I.1**.

Tabla I.1. Relación de especies capturadas utilizadas en este estudio epidemiológico.

Especie	Nombre común	2019	2020	2021	Total
Belone belone	Aguja	10			10
Conger conger	Anguilacho		10		10
Micromesistius poutassou	Lirio	150	66	110	326
Dicentrarchus labrax	Lubina	67	19	1	87
Diplodus sargus	Sargo	12	9	4	25
Labrus bergylta	Maragota	1	1		2
Lepidorhombus boscii	Gallo	220	114	61	395
Merluccius merluccius	Merluza	62	31	18	111
Pagellus bogaraveo	Besugo	3			3
Pleuronectes platessa	Platija	1	5		6
Pollachius pollachius	Abadejo	2	1		3
Sardina pilchardus	Sardina	79	83	21	183
Scomber scombrus	Caballa	25			25
Scorpaena scrofa	Cabracho	5			5
Scophtalmus rhombus	Rémol		4		4
Trachurus trachurus	Jurel	47	21	14	82

Los peces se capturaron en el Océano Atlántico (FAO, Zona 27, Subzona 27.8 – 27.9; **Fig. I.1**) en donde la temperatura del agua se encuentra en torno a los 15 ± 1 ºC (Boya de Ribeira, Meteogalicia). Las muestras, que representaban la región anterior de los individuos, se recogieron de una lonja local (Lonxa de Ribeira, A Coruña), dos veces por semana, entre los meses de marzo a septiembre del trienio 2019-2021.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

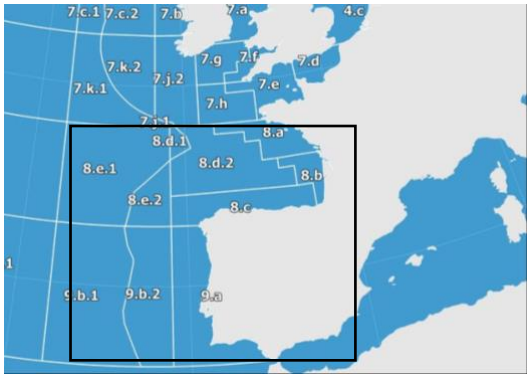


Figura I.1. Mapa de la zona 27 de pesca descrita por la FAO, que incluye las subzonas 8 y 9, donde se realizaron las capturas para este estudio epidemiológico.

1.2.2. Línea celular

En este trabajo se utilizó la línea celular E-11, cultivada en medio L-15 de Leibovitz, suplementado con un 5 % de suero fetal bovino (SFB). Los cultivos se incubaron a 25 ºC hasta alcanzar una monocapa semiconfluente (~80 %), y en ese momento, el medio de cultivo se sustituyó por medio de mantenimiento (L-15 con 2 % de SFB) y se mantuvieron a 20 ºC. Para la individualización y subcultivo de los tapices se utilizó tripsina diluida al 4 % en tampón diluyente (NaCl 0,14 M; KH_2PO_4 1,47 mM; Na_2HPO_4 8,1 mM; Na EDTA 0,54 mM; rojo fenol 0,1%; pH 7,0) siguiendo el protocolo descrito por Kuchler (1977).

1.2.3. Procesado de las muestras

Los ojos y el tejido cerebral de las muestras de los peces se retiraron de forma aséptica, y se procesaron individuamente. Para ello, se homogeneizó el tejido con un rodillo y se añadió solución tamponadora Earle's (Hyclone Laboratorios Inc.), suplementada con antibióticos y antifúngicos (1000 UI/ml de penicilina, 1000 µg/ml de estreptomicina, 500 µg/ml de gentamicina y 10-20 µg/ml de anfotericina B), en una relación 1:10. Los homogeneizados se clarificaron mediante centrifugación durante 2 minutos a 11.000 × g y el sobrenadante se incubó hasta el día siguiente a 4 ºC. A continuación, se realizaron dos diluciones decimales (1:10 y 1:100) que se inocularon por duplicado en placas de 48 pocillos con monocapas semiconfluentes de E-11. Las placas se incubaron a 25°C y se examinaron diariamente para visualizar

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

la posible presencia de efecto citopático (ECP). Tras 10 días, se hizo un segundo pase, inoculando 100 µl de la suspensión celular en nuevos cultivos durante 10 días adicionales, para confirmar la presencia o ausencia de partículas virales infectivas.

1.2.4. Cuantificación de carga viral

1.2.4.1. Extracción de ARN total

El ARN de las muestras se extrajo a partir de 200 µl del sobrenadante de los tejidos homogeneizados, siguiendo el método del fenol-cloroformo. De forma resumida, el protocolo comenzó con la incubación de la muestra durante 1 h a 56 ºC en presencia de dodecilsulfato sódico (SDS) al 10 % y 2 µg/µl de proteinasa K (Sigma). A continuación, se añadieron 400 µl de una solución fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), y se mezcló enérgicamente antes de centrifugar a 12.000 × g durante 15 min a 4 ºC. La fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo con solución cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y se agitó y centrifugó como en el paso anterior. La fase acuosa se trató con 10 µl de acetato de sodio (0,3 mM) y 3 volúmenes de etanol absoluto a -20 ºC. Tras una incubación de 20 min a -20 ºC, el ARN se precipitó mediante centrifugación a 12.000 × g durante 30 min. El precipitado se lavó con 500 µl de etanol 75 % para eliminar el exceso de sales y se centrifugó de la misma forma durante 5 min, descartando el sobrenadante. El ARN precipitado se dejó secar a temperatura ambiente y se resuspendió en 50 µl de agua libre de nucleasas.

El rendimiento de la extracción de ARN se determinó mediante espectrofotometría a partir de 2 µl de muestra en un *Nanodrop ND-1000* (NanoDrop Technologies). Para ello, se midió la absorbancia a 260 nm (A_{260}) utilizando como blanco el agua libre de nucleasas en la que se resuspendió el ARN. La pureza del ARN, en términos de ausencia de contaminantes orgánicos y/o proteínas, se estimó con la ratio A_{260}/A_{280}. Valores de 2 ± 0,1 son indicativos de un alto nivel de pureza (Ausubel y col., 1995).

1.2.4.2. Transcripción inversa

Para la síntesis del ADNc, se utilizó el kit RevertAid (Thermoscientific Inc.). La reacción se llevó a cabo en un termociclador MyCycler™ (Bio-Rad),

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

comenzando con la desnaturalización del ARN (9 µl) durante 5 min a 95 ºC en presencia de cebadores aleatorios (200 mM). Seguidamente, la temperatura se redujo a 4 ºC, y se añadieron los restantes componentes de la reacción incluyendo 4 µl del tampón de reacción 5X (compuesto por 250 mM de Tris-HCl, pH 8,3, 250 mM de KCl, 20 mM de $MgCl_2$ y 50 mM de DTT), 10 mM de desoxinucleótidos trifosfatados (dNTP), 200 unidades de la enzima *RevertAid Reverse Transcriptase* y 4,8 µl de agua libre de nucleasas, para un volumen final de 20 µl. El protocolo se retomó aumentando la temperatura a 25 ºC durante 10 min y, a continuación, se mantuvo 60 min a 42 ºC para la síntesis de la hebra de ADNc. Finalmente, la enzima se inactivó a 70 ºC durante 10 min.

1.2.4.3. PCR cuantitativa (qPCR)

Las reacciones de qPCR se realizaron en placas de 96 pocillos en un volumen final de 20 µl, utilizando 2 µl de ADNc, al que se añadieron 10 µl del tampón de reacción iQ™ SYBR® Green Supermix (Bio-Rad) y 200 nM de cebadores SnodR1 F/R (5′-TCCAAAAGAAAGAAGCATAC-3′ / 5′-TGGCATGTACCACGGAAC-3′), diseñados para la amplificación del ARN1 (Olveira y col., 2013). El perfil térmico de amplificación comenzó con la activación de la enzima durante 30 s a 95 ºC seguido de 40 ciclos de desnaturalización (5 s a 95 ºC) y un paso de unión-extensión (5 s a 60 ºC). Tras la amplificación, la reacción se completó con un análisis de la curva de temperatura de fusión de 65 a 95 ºC (5 s/paso, velocidad de rampa de 0,5 °C/s). La cuantificación absoluta del ARN1 se estimó comparando los valores del ciclo de cuantificación, con una curva estándar generada con diluciones seriadas de orden 20 del segmento completo del ARN1 de la cepa SpSsIausc160.03, contenido en un plásmido (disponible en el grupo de virología del Instituto de Acuicultura, USC; Souto y col., 2015b). Las diluciones se prepararon en agua libre de nucleasas a partir de una concentración inicial de $2{,}91 \times 10^7$ copias de ARN/ml hasta $2{,}27 \times 10^{-2}$ copias de ARN/ml.

1.2.4.4. TaqMan PCR

El genotipo de VNNV se determinó utilizando las sondas TaqMan PCR. Cada reacción se realizó en un volumen final de 20 µl, incluyendo 2µl del

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

cDNA, 200 nM de cada pareja de cebadores (**Tabla I.2A**), 0,1 µl de sonda TaqMan (**Tabla I.2B),** y 10 µl 2X de Premix Ex Taq (TaKaRa). El perfil térmico comenzó con una incubación durante 30 seg a 95 ºC, seguido de 40 ciclos de unión-extensión a 95 ºC durante 15 seg y 59 ºC durante 30 segundos.

Tabla I.2. Relación de cebadores **(A)** y sondas **(B)** utilizados para el genotipado de las muestras mediante TaqMan PCR.

Cebadores		
Genotipo	**Forward (5'-3')**	**Reverse (5'-3')**
	ARN1	
BFNNV	AGCTCCTCAAGCACATTGCG	GACAGACATCTTCGGTTCCAAATC
RGNNV	TCTCCAGTGACATTTCTGTCTCG	TGTGTCTTAGCCCAGCCAATG
SJNNV	ACAGAATTGTCCACACTATTGGG	AAGATATGAGACGAAAGCATTTGC
TPNNV	ATCACTGGCATTACCGCTCTG	GGGACAATCGACACAATGTTACG
	ARN2	
BFNNV	CATCACAATGGTACGCAAAGGG	AAGGTGCATCCGCTCTCATG
RGNNV	TACGCAAAGGTGAGAAGAAATTGG	CGATTACTACGCCGACGATTG
SJNNV	GGAACAGATGGAAAGATTGTCGTC	GGGCACATTGGCTGAATTTCG
TPNNV	GGACGGATATGTCGTGGTCAAC	TCCAGTGTTTCAACAATGTATCGC

Sondas TaqMan		
	ARN1 (5'-3')	ARN2 (5'-3')
BFNNV	AACCAGTGGACTTCCCCGCCTGAC	AAACCAGCGACCACAAAGGCCGTT
RGNNV	ACCGGCTTCCGTGCAGTCGCC	AAAACCCGCGACCACCAAGGCC
SJNNV	AACTCCAAGCACCTGCTGTCACCC	CTGCCACGGCTTGGACACGCTGCT
TPNNV	AAACTGGGAATCGCGCCCTTTGGC	CTGCCACGGCTTGGACACGCTGCT

1.2.5. Propagación de los aislados y secuenciación

Los aislados obtenidos en cultivo celular se propagaron mediante adsorción en monocapas de células E-11 cultivadas durante 24 horas en frascos de cultivo celular de 75 cm^2, según se describió en el apartado 1.2.2. Para la inoculación viral, se retiró el medio de cultivo celular y se añadieron 100 µl de la suspensión viral a una multiplicidad de infección (*multiplicity of infection*; MOI) de 0,1-1. Tras 1 h de incubación en agitación suave, el inóculo se sustituyó por medio de mantenimiento y se incubó a 25ºC. Cuando se visualizó el ECP en todo el frasco, se recogió la suspensión viral y se centrifugó a 3.000 × g durante 15 minutos, lo que se consideró virus "crudo", y se almacenó a -80 ºC hasta su uso.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

A continuación, se procedió a la secuenciación del virus "crudo", previa extracción y reverso transcripción del ARN siguiendo el proceso descrito en los apartados 1.2.4.1 y 1.2.4.2. El ADNc se amplificó mediante PCR, utilizando el kit *Accuprime Taq DNA polymerase High Fidelity* (Thermo Fisher Scientific) y 0,5 µM de cada pareja de cebadores descritos en la **Tabla I.3**. El perfil térmico de la PCR consistió en una desnaturalización inicial a 94 ºC durante 2 min, seguido de 35 ciclos de amplificación (94 ºC 30 s, 58 ºC 30 s, y 68 ºC 1 min), y se finalizó con una incubación a 68 ºC durante 5 min. Los productos de PCR se purificaron de un gel de agarosa 2 % teñido con RedSafe™ Nucleic Acid Staining Solution, utilizando el kit *NZYGelpure* (NZYTech) y se secuenciaron utilizando la pareja de cebadores correspondiente. Las secuencias nucleotídicas de las moléculas de ARN1 y ARN2 de cada aislado se registraron en la base de datos GenBank.

Tabla I.3. Lista de cebadores utilizados para la secuenciación completa de los aislados de VNNV obtenidos en este trabajo.

Nombre cebador	Forward (5' - 3')	Posición ORF w160.03	Tamaño amplicón
	RNA1		
Nod1BR1F	CGCAAGGTTACCGTTTAGC	37-55	669
Nod1BR1R	CATGGTATCCTGGTTGTAGTTCC	683-705	
Nod1BR2F	CAAGTACTGTGTCCGGAGAGGTTA	581-604	669
Nod1BR2R	GAGCAAGATCGCCAGGTTTATG	1228-1249	
Nod1BR3F	AACATCCGCACTGCATACGAACTG	1090-1113	651
Nod1BR3R	ATGCTGGAGAACACTGGCTTTGAA	1717-1740	
Nod1BR4F	AATGCCCCAAATTATCCCAGGAAC	1639-1662	800
Nod1BR4R	GCCCGGCACCAATGACCAATAAAA	2415-2438	
Nod1BR5F	CGACATTGGCTGGGCTAAGACACA	2361-2384	744
Nod1BR1R	GCCGAAGCGTAAGACAGCATAAAG	3081-3104	
F7	ATATCACGATGAGTTCACTA	1584-1603[a]	642
R7	CGATTCACTATTTTCAAGTC	2206-2225[a]	
	RNA2		
NNVs2_1f	AAGTCAAAATGGTACGCAAAGGTG	20-43	527
NNVs2_1r	CTTCCCGGTTGAGGTCCAGAGA	525-546	
NNVs2_2f	GCTTCCTGCCTGATCCAACTGA	404-425	568
NNVs2_2r	GGCGCCCCAACTGTGAATGTCT	950-971	
NNVs2_3f	CGGTTACACTGGATTTCGTTC	732-752	655
NNVs2_3r	ACATGGCGGTGGTGCTC	1370-1386	
F2	CGTGTCAGTCATGTGTCGCT	615-634[b]	427
R3	CGAGTCAACACGGGTGAAGA	1022-1041[b]	

(a) Nevarez y col. Virologie **2005**, 9, 115-166. (b) Nishizawa y col. Dis Aquat Organ **1994**, 18, 103-107.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.2.6. Análisis filogenético

Para el análisis filogenético, se utilizó la secuencia parcial de ambos segmentos genómicos (ARN1: 904 pb; ARN2: 518 pb) de cada aislado, editada con el programa Geneious Prime (Geneious v. 2022.1.1, Bio-matters, http://www.geneious.com/). El modelo de ajuste se estimó con el software JModelTest (Darriba y col., 2012), comparando la secuencia de ambas moléculas de ARN con las de los cuatro genotipos parentales (4 RGNNV, 2 SJNNV, 4 BFNNV y 1 TPNNV) y 17 cepas recombinantes (RGNNV/SJNNV) depositadas en GenBank (**Tabla I.4**). La relación filogenética se estableció mediante inferencia bayesiana empleando el modelo HYK + G en el programa BEAST 1.10.4, y se realizaron 1.000.000 de árboles utilizando cuatro cadenas de Markov. Para obtener un árbol consenso, se descartaron los 10.000 árboles menos representativos y, a continuación, se muestrearon cada 1.000. La robustez de la representación filogenética se indicó mediante la Probabilidad Posterior de Bayes (PP), considerando significativos aquellos valores con un porcentaje superior al 70%. Los árboles se enraizaron utilizando la secuencia de dos alfanodavirus como grupo externo: Virus Nodamura [NoV; número de acceso del GenBank NC_002690 (ARN1), NC_0026911 (ARN2)] y virus Black Beetle [BBV; NC_001411 (ARN1), NC_002037 (ARN2)].

La identidad por pares de nucleótidos y aminoácidos de cada aislado se determinó mediante el alineamiento de la secuencia codificante con las secuencias recogidas en la **Tabla I.4**. En esta comparación se prestó especial atención a las cepas SpSsIAUSC160.03 (en adelante, Ss160.03) y SpSaIAUSC382.17 (en adelante, Sa382.17), aisladas de brotes de ERV en lenguados y en doradas en el sur de España, respectivamente, ya que se utilizarán en las infecciones experimentales realizadas en esta tesis doctoral. La primera de ellas, considerada como la cepa recombinante tipo en nuestro laboratorio, fue caracterizada con anterioridad por Olveira y col. (2009), mientras que la cepa Sa382.17 se describirá por primera vez en este capítulo.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla I.4. Relación de cepas utilizadas para la caracterización filogenética y aminoacídica de los aislados obtenidos en este capítulo.

Virus	Año	Especie	Lugar	Núm. GenBank	
				ARN1	ARN2
		RGNNV/SJNNV			
SaIAUSC61_05 [1]	2005	Dorada	Portugal	FJ803912	FJ803918
SaIAUSC74_05[1]	2005	Dorada	Portugal	FJ803913	FJ803919
SsIAUSC573_04[1]	2004	Lenguado	Portugal	FJ803914	FJ803920
SaIAUSC156_03[1]	2003	Dorada	España	FJ803916	FJ803921
SsIAUSC160_03[1]	2003	Lenguado	España	FJ803911	FJ803923
SsIAUSC1974_08[1]	2008	Lenguado	España	FJ803917	FJ803922
SpSaIAUSC382_17	2017	Dorada	España	MT707973	MT707974
430.2004[2]	2004	Lenguado	Italia	JN189911	JN189932
477.2004[2]	2004	Lenguado	Italia	JN189913	JN189938
17.1C.2004[2]	2004	Lubina	Italia	JN189900	JN189934
367.2.2005[2]	2005	Lubina	Italia	JN189909	JN189936
82.4.2007[2]	2007	Dorada	Italia	JX290516	JX290518
69-4/Mar2009[2]	2009	Dorada	Italia	KY354683	KY354695
203-3/May2010[2]	2010	Dorada	Italia	KY354685	KY354697
461-1/Nov2014[2]	2014	Dorada	Italia	KY354688	KY354702
127-1/Mar2015[2]	2015	Dorada	Italia	KY354692	KY354704
575/Nov2015[2]	2015	Dorada	Italia	KY354691	KY354705
165-6/Mar2016[2]	2016	Dorada	Italia	KY354693	KY354706
		RGNNV			
G9508KS[3]	2002	Mero de pintas rojas	Japón	AY690597	AY690596
PmIAUSC1586_10[4]	2010	Rodaballo	España	KC696563	KC696562
SGWak97[5]	1997	Mero de pintas rojas	Japón	NC_008040	NC_008041
DlIAUSC1688_08[4]	2008	Lubina	España	FJ803915	FJ829452
		SJNNV			
SJNNV[6]	1993	Jurel dentón	Japón	AB025018	-
SJ_G91[7]	1993	Jurel dentón	Japón	-	D30814
SJ93Nag[8]	1993	Jurel dentón	Japón	AB056571	AB056572
		BFNNV			
BF93Hok[7]	1993	Barfin flounder	Japón	EU826137	EU826138
AH99NorA[9,10]	1995	Fletán	Noruega	AJ401165	AJ245641
Ac06NorT[11]	2007	Bacalao	Noruega	EF617330	EF617329
GmMR11_06[12]	2008	Bacalao	Noruega	EF433472	EF433468
		TPNNV			
TPKag93[7]	1993	Tigger puffer	Japón	AM085332	D38637

[1]Olveira y col. J Gen Virol **2009**, 90, 12, 2940-2951. [2] Volpe y col. Aquaculture **2020**, 523, 735155. [3]Lee y col. J Gen Virol **2002**, 83, 10, 2469-2474. [4]Olveira y col. Aquaculture 2013, 406, 125-130. [5]Iwamoto y col. J Virol **2004**, 78, 1256-1262. [6]Nagai y Nishizawa. J Virol **1999**, 80, 3019-3022. [7]Nishizawa y col. J Gen Virol **1995**, 76, 1563-1569. [8]Iwamoto y col. J Gen Virol **2001**, 82, 2653-2662. [9]Grotmol y col. Dis Aquat Organ **2000**, 39, 79-88. [10]Sommerset y Nerland, 2004, 58, 117-125. [11]Patel y col. Datos no publicados. [12]Nylund y col. Arch Virol **2008**, 153, 541-547.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.2.7. Infección experimental

Se utilizaron un total de 370 juveniles de lenguado (peso corporal medio 1 ± 0,1 g), proporcionados por una piscifactoría local (Stolt Sea Farm, S.L.). A su llegada a las instalaciones del acuario de la Universidad de Santiago de Compostela, se analizó la presencia de agentes virales y bacterianos, sacrificando una muestra de 10 individuos con una sobredosis del anestésico metasulfonato de tricaína (MS-222, Sigma-Aldrich). En el análisis virológico, se descartó, mediante qPCR, la presencia de betanodavirus (VNNV), del virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV), del virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (IHNV) y del virus de la septicemia hemorrágica viral (VHSV). En cuanto al análisis bacteriológico, se descartó la presencia de agentes bacterianos mediante la siembra de bazo y riñón en medio de cultivo general Agar Triptona-Soja (TSA-1) y medio selectivo para *Vibrio* (Agar Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa, TCBS).

Los peces se distribuyeron de forma aleatoria en 18 tanques opacos de 50 l (20 peces/tanque), con aireación continua y fotoperíodo 12:12 en un sistema de agua cerrado (salinidad 33 g/l), y se siguió una alimentación *ad libitum* con pienso comercial. Tras un período de aclimatación de 1 semana a 16 ºC (temperatura de las instalaciones), la temperatura del agua se incrementó progresivamente a razón de 1 ºC / día, hasta los 18 ± 1 ºC en la mitad de los tanques y hasta los 22 ± 1 ºC en los restantes.

A continuación, se realizaron las infecciones experimentales a 18 ºC y 22 ºC mediante baño con los 4 aislados obtenidos en este estudio. Las infecciones se llevaron a cabo con una concentración de virus de 10^5 $TCID_{50}$/ml durante 3 h con fuerte aireación. Cada aislado se evaluó por duplicado a 18 ºC y 22 ºC y, además, se estableció un grupo bañado con medio de cultivo L-15, como control de infección para cada temperatura. Durante la inmersión, se tomó una alícuota de 1 ml del agua del tanque de infección para confirmar la dosis de virus. Se muestrearon también 3 peces de cada tanque cada 7 días, y los experimentos se terminaron en el día 30 post infección (pi). Diariamente se revisaron los tanques para retirar las bajas y para detectar signos de ERV.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.2.8. Procesado de las muestras y análisis virológico

Las muestras de agua se filtraron por una membrana de 0,22 µm y se incubaron hasta el día siguiente con la solución antibiótica y antimicótica descrita en el apartado 1.2.3. Las muestras de lenguado se procesaron retirando asépticamente la porción anterior de la cabeza, y se homogenizaron individualmente como se describió en la sección 1.2.3.

La cuantificación de carga viral se realizó mediante RT-qPCR, a partir de 200 µl de agua o 200 µl del homogeneizado de las muestras, siguiendo el protocolo descrito en el apartado 1.2.4. Además, la carga viral en el agua se evaluó también mediante titulación en placas de 96 pocillos con monocapas semiconfluentes de E-11, inoculando por triplicado diluciones decimales seriadas de la muestra. Tras una incubación de 10 días a 25 ºC, se calculó el título por el método de dilución final y se expresó como *dosis infectiva 50/ml* ($TCID_{50}$/ml), siguiendo el método descrito por Reed y Müench (1938).

1.2.9. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se realizó utilizado el Software GraphPad Prism 8.1. Los datos de cuantificación de carga viral se analizaron mediante análisis de varianza (ANOVA) de dos vías con corrección de Tukey, y se establecieron diferencias significativas para un *p* valor inferior a 0,05.

1.3. Resultados

1.3.1. Análisis virológico

El análisis de los 1277 peces mediante RT-qPCR reveló la presencia del VNNV en un 1,72 % de los individuos, y en todas las especies el porcentaje de positivos fue inferior al 5% (**Tabla I.5**). Las especies con la mayor relación de positivos (4 %) fueron la caballa y el sargo, y en ambos casos se encontró un único individuo portador de VNNV (1/25). A continuación, se situaron las sardinas (3,83 %, 7/183), jureles (3,6 %, 3/82), merluzas (2,7 %, 3/111) y lubinas (2,3 %, 2/87). Por último, el porcentaje de positivos cayó a valores por debajo del 1 % en lirio (0,92 %; 3/326) y gallo (0,51 %; 2/395), y no se encontraron evidencias del patógeno en cabracho, rémol, abadejo, platija, besugo, maragota, congrio o aguja.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla I.5. Porcentaje de individuos positivos para el VNNV detectados mediante RT-qPCR en cada especie.

Nombre común	Tamaño muestral	Nº + RT-PCR	% + RT-PCR
Aguja	10	0	0,00%
Lirio	326	3	0,92%
Congrio	10	0	0,00%
Lubina	87	2	2,30%
Sargo	25	1	4,00%
Maragota	2	0	0,00%
Gallo	395	2	0,51%
Merluza	111	3	2,70%
Besugo	3	0	0,00%
Platija	6	0	0,00%
Abadejo	3	0	0,00%
Sardina	183	7	3,83%
Caballa	25	1	4,00%
Rémol	4	0	0,00%
Cabracho	5	0	0,00%
Jurel	82	3	3,66%
Totales	**1277**	**22**	**1,72 %**

Los individuos que mostraron un resultado positivo mediante RT-qPCR se analizaron con sondas TaqMan, para determinar el genotipo del VNNV. Este nuevo ensayo permitió detectar el recombinante RGNNV/SJNNV en el 55 % de los individuos, mientras que el 45 % restante contenía genoma tipo SJNNV (**Tabla I.6**). El genotipo presente en gallos y lubinas fue el SJNNV, mientras que en el único individuo de sargo se detectó un recombinante. En las restantes especies estaban presentes ambos tipos virales, aunque no se detectaron infecciones mixtas.

Tabla I.6. Relación de genotipos de VNNV detectados en cada especie.

Nombre común	RGNNV/SJNNV	SJNNV
Gallo		2
Lirio	2	1
Lubina		2
Sargo	1	
Merluza	2	1
Sardina	6	1
Caballa	1	
Jurel		3

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

La inoculación de las muestras en cultivo celular permitió la obtención de 4 aislados, todos ellos recombinantes RGNNV/SJNNV a partir de sardina (3) y caballa (1), denominados SpSpIAusc756.19 (en adelante, Sp756.19), SpSpIAusc939.20 (Sp939.20), SpSpIAusc997.21 (Sp997.21) y SpSscIAusc1002.21 (Ssc1002.21), respectivamente. Las secuencias de ambos segmentos genómicos se depositaron en la base de datos GenBank con los números de acceso recogidos en la **Tabla I.7**.

Tabla I.7. Números de acceso en la base de datos GenBank de la secuencia de ambos segmentos genómicos de los aislados obtenidos en este estudio.

Cepa	ARN1	ARN2
SpSpIAUSC756.19	ON745747	ON745751
SpSpIAUSC939.20	ON745748	ON745752
SpSpIAUSC997.21	ON745749	ON745753
SpSscIAUSC1002.21	ON745750	ON745754

1.3.2. Caracterización filogenética

Los aislados de VNNV se caracterizaron filogenéticamente para establecer posibles relaciones con otras cepas recombinantes descritas con anterioridad. Además, con fines comparativos también se establecieron las relaciones filogenéticas de las cepas Ss160.03 y Sa382.17.

El análisis bayesiano agrupó el aislado de caballa (Ssc1002.21) y los tres de sardina (Sp756.19, Sp939.20, y Sp997.20), junto con las cepas Ss160.03 y Sa382.17, y otras cepas recombinantes con ARN1 tipo RGNNV (**Fig. I.2**) y ARN2 tipo SJNNV (**Fig. I.3**), aisladas en la península ibérica e Italia. En ambos segmentos genómicos, se observó un grupo monofilético compuesto por el aislado Sp756.19 y la cepa Sa382.17 (PP RNA1: 1; RNA2: 0,99), formado a partir del evento de especiación que dio lugar a algunos recombinantes de dorada obtenidos en Italia, denominados 203-3/may2010 y 127-1/mar2015.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

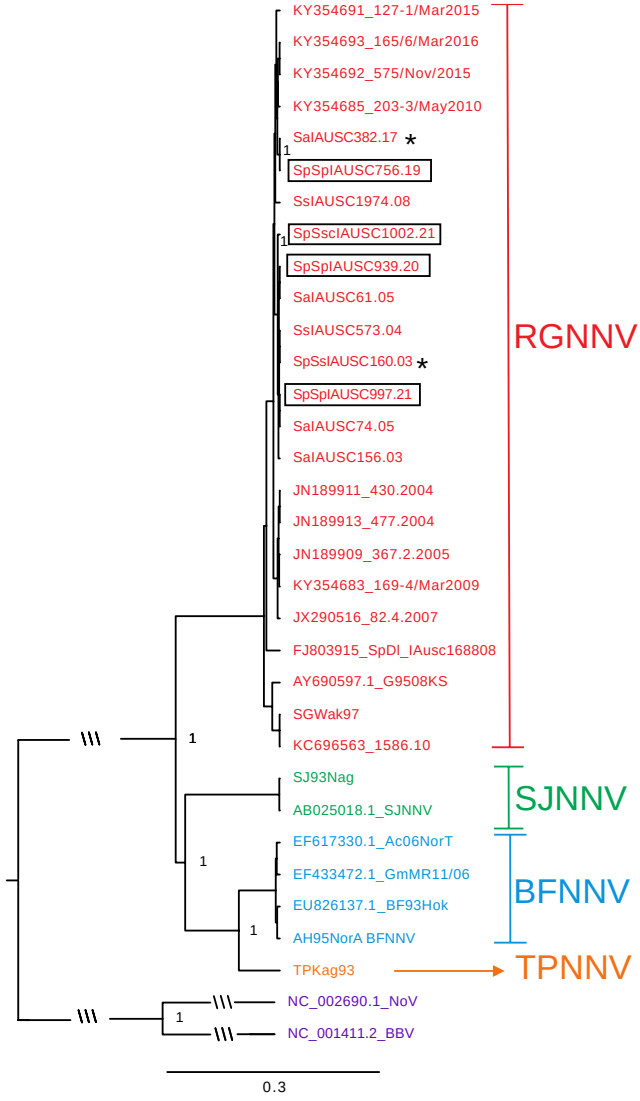


Figura I.2. Representación filogenética de la molécula de ARN1 de los cuatro aislados obtenidos en este capítulo (recuadro), con respecto a otros aislados recombinantes obtenidos en la Península Ibérica e Italia, y cepas representativas de los cuatro genotipos BFNNV, RGNNV, SJNNV y TPNNV. Los asteriscos (*) indican la posición de los recombinantes Ss160.03 y Sa382.17. Los números muestran la probabilidad posterior (PP) Bayesiana obtenida del árbol consenso muestreado cada 1.000 generaciones tras descartar los 10.000 árboles menos representativos. La barra de escala indica el número de sustituciones nucleotídicas por sitio.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

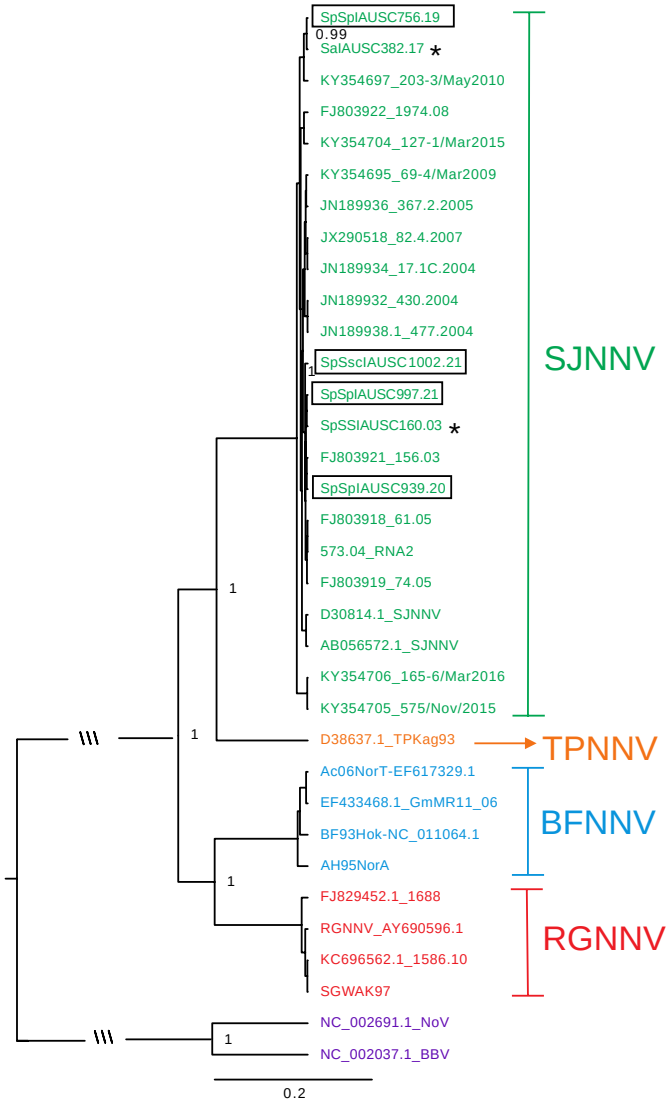


Figura I.3. Representación filogenética de la molécula de ARN2 de los cuatro aislados obtenidos en este capítulo (recuadro), con respecto a otros aislados recombinantes obtenidos en la Península Ibérica e Italia, y cepas representativas de los cuatro genotipos BFNNV, RGNNV, SJNNV y TPNNV. Los asteriscos (*) indican la posición de los recombinantes Ss160.03 y Sa382.17. Los números representan la probabilidad posterior (PP) Bayesiana obtenida del árbol consenso muestreado cada 1.000 generaciones tras descartar los 10.000 árboles menos representativos. La barra de escala indica el número de sustituciones nucleotídicas por sitio.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Sin embargo, esta representación no permite diferenciar detalladamente las relaciones de los otros 3 aislados, ya que la distancia entre ellos es muy reducida. Por tanto, se realizó una nueva reconstrucción filogenética incluyendo únicamente los 4 aislados obtenidos en este estudio y algunas cepas recombinantes secuenciadas en nuestro laboratorio.

Esta nueva representación filogenética (**Fig. I.4A** y **I.B**) indicó que el evento de especiación por el que se formó el clado que incluye el aislado Sp756.19 y la cepa Sa382.17, dio lugar a la formación del ancestro común a los restantes aislados recombinantes, en ambos segmentos genómicos (PP = 1).

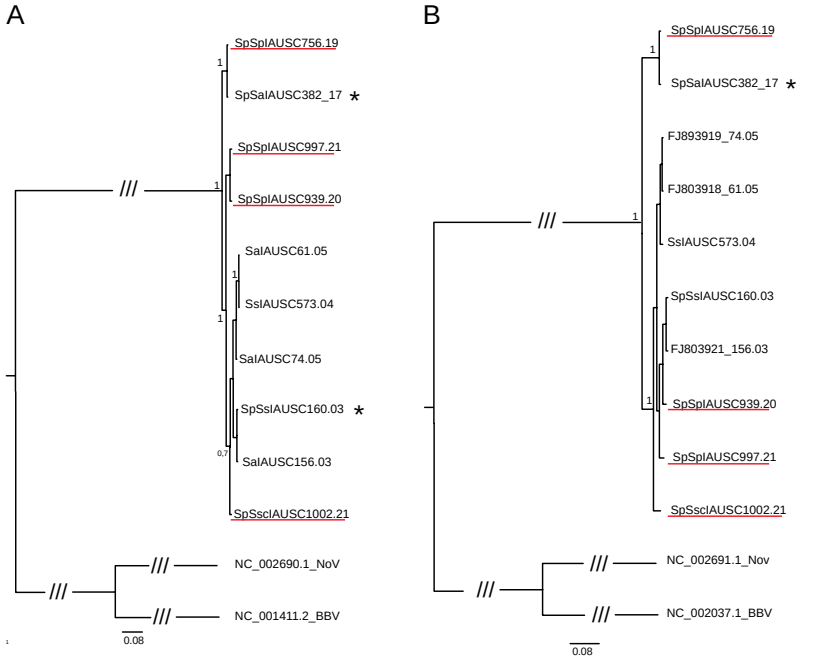


Figura I.4. Representación filogenética de la molécula de ARN1 **(A)** y ARN2 **(B)** de los cuatro aislados obtenidos en este capítulo (subrayado en rojo), con respecto a otros aislados recombinantes obtenidos en nuestro laboratorio. Los asteriscos (*) indican la posición de las recombinantes Ss160.03 y Sa382.17. Los números representan la probabilidad posterior (PP) Bayesiana obtenida del árbol consenso muestreado cada 1.000 generaciones tras descartar los 10.000 árboles menos representativos. La barra de escala indica el número de sustituciones nucleotídicas por sitio.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

En detalle, la representación filogenética de la secuencia del ARN1 (**Fig. I.4A**) indica que la cepa Ssc1002.21 comparte ancestro con las cepas recombinantes aisladas con anterioridad en nuestro laboratorio, entre las que se encuentra la cepa Ss160.03, aislada de lenguados (PP = 0,7). Este ancestro común se desarrolló a partir del mismo evento de especiación que permitió la divergencia del clado formado por los aislados Sp939.20 y Sp997.21 (PP = 1).

En cuanto a la molécula de ARN2 (**Fig. I.4B**), la cepa Sp939.20 forma un grupo hermano al clado que incluye la cepa Ss160.03. El ancestro común de estos dos grupos divergió a partir del mismo evento de especiación que dio lugar a la diferenciación del aislado Sp997.21. La aparición del aislado Ssc1002.21 pudo tener lugar durante el mismo evento de especiación por el cual divergieron los restantes recombinantes analizados (PP = 1).

1.3.3. Porcentaje de homología nucleotídica

Los porcentajes de homología de las moléculas de ARN1 y ARN2 de estos 4 aislados se estimaron con respecto a la secuencia de nucleótidos de las cepas SGWak97 y SJNag93, respectivamente. Asimismo, se analizó la similitud con otros aislados recombinantes obtenidos en la península ibérica.

En primer lugar, en cuanto a la molécula de ARN1 (**Tabla I.8**), el porcentaje de homología observado entre los cuatro aislados es del 99 – 99,1 %, mientras que con respecto a la cepa SGWak97, oscila entre el 96,6 – 97,2 % (Sp756.19: 96,6 %; Sp939.20: 97,1 %; Sp997.21: 97 %; Ssc1002.21: 97,2 %). Por otra parte, la homología de la cepa Sa382.17 con la cepa parental fue del 96,5 %, mientras que con respecto al aislado Sp756.19, fue del 99,8 %, y con los 3 restantes, los valores oscilaron entre 99 y 99,2 %. Con respecto a la cepa Ss160.03, la mayor homología se observó en el aislado Sp997.21 (99,9 %), seguido del Sp939.20 y Ssc1002.21 (99,8 %), y finalmente el Sp756.19 (99,2 %). La comparación por pares con las demás cepas recombinantes mostró resultados similares, con valores superiores al 99 % en todos los casos.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla I.8. Porcentaje de identidad (% ID) por pares del ORF del ARN1 de los aislados obtenidos en este capítulo (subrayados) con respecto a la cepa parental SGWak97 y otros aislados recombinantes obtenidos en nuestro laboratorio.

% ID	SGWak97	Ss160.03	Sa382.17	Sp756.19	Sp939.20	Sp997.21	Ssc1002.21	Sa156.03	Ss573.04	Sa61.05	sa74.05	Ss1974.08
SGWak97	--	97,2	96,5	96,6	97,1	97,0	97,2	97,0	97,1	97,1	97,1	96,5
Ss160.03		--	99,3	99,2	99,8	99,9	99,8	99,9	99,9	99,9	99,9	99,3
Sa382.17			--	99,8	99,1	99,2	99,0	99,2	99,1	99,1	99,2	99,0
Sp756.19				--	99,0	99,1	99,0	99,1	99,1	99,1	99,2	99,9
Sp939.20					--	99,7	99,4	99,7	99,7	99,7	99,8	99,1
Sp997.21						--	99,6	99,8	99,7	99,7	99,8	99,2
Ssc1002.21							--	99,6	99,6	99,6	99,7	99,1
Sa156.03								--	99,8	99,8	99,9	99,2
Ss573.04									--	99,9	99,9	99,2
Sa61.05										--	99,9	99,2
Sa74.05											--	99,3
Ss1974.08												--

Por otra parte, la molécula de ARN2 de los 4 aislados mostró un porcentaje de identidad con la cepa parental SJNag93 alrededor del 98 % (97,7 – 98,2 %), porcentaje muy similar a los obtenidos en la comparación por pares entre los cuatro aislados (**Tabla I.9**), aunque inferior a la comparación con la cepa Ss160.03 (98,1 – 99,7 %). En el caso de la cepa Sa382.17, que presenta una homología con la cepa parental de 98,3 %, el aislado Sp756.19 alcanzó el 99,9 % de identidad, mientras que, en los otros tres, la homología osciló entre 97,6 – 98,1 %. Finalmente, considerando los demás recombinantes, el análisis por pares mostró porcentajes en el rango 97,8 – 99,8 %.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla I.9. Porcentaje de identidad (% ID) por pares del ORF del ARN2 de los aislados obtenidos en este capítulo (subrayados) con respecto a la cepa parental SJNag93 y otros aislados recombinantes obtenidos en nuestro laboratorio.

% ID	SJNag93	Ss160.03	Sa382.17	Sp756.19	Sp939.20	Sp997.21	Ssc1002.21	Sa156.03	Ss573.04	Sa61.05	Sa74.05	Ss1974.08
SJNag93	--	98,3	98,3	98,2	98,2	97,7	98,0	98,3	98,2	98,2	98,1	98,4
Ss160.03		--	98,2	98,1	99,7	99,3	99,5	99,9	99,6	99,6	99,5	98,4
Sa382.17			--	99,9	98,1	97,6	98,0	98,3	98,1	98,2	98,1	99,2
Sp756.19				--	98,1	97,7	97,9	98,2	98,0	98,1	98,1	99,1
Sp939.20					--	99,0	99,4	99,8	99,5	99,5	99,4	98,3
Sp997.21						--	98,8	99,2	98,9	98,9	98,8	97,8
Ssc1002.21							--	99,6	99,3	99,3	99,2	98,1
Sa156.03								--	99,7	99,7	99,6	98,5
Ss573.04									--	99,8	99,7	98,2
Sa61.05										--	99,9	98,4
Sa74.05											--	98,3
Ss1974.08												--

1.3.4. Comparación aminoacídica

Los aislados de VNNV obtenidos en este capítulo presentan cambios en la secuencia de aminoácidos en la polimerasa (RdRp) y en la proteína de la cápside con respecto a las cepas parentales SGWak97 y SJNag93, respectivamente.

Como se muestra en la **Tabla I.10**, la mayor parte de los cambios aminoacídicos observados con respecto a la cepa SGWak97 se localizan en la región C-terminal de la proteína RdRp, y están presentes en todas las secuencias analizadas. El aislado Sp756.19 (procedente de sardina) presenta, al igual que el Sa382.17 (obtenido de doradas cultivadas en el Mediterráneo), 24 sustituciones con respecto a la secuencia de la cepa parental RGNNV, muchas de ellas compartidas por todos los recombinantes. Sin embargo, 2 de

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

esas mutaciones ($212_{Cys \rightarrow Arg}$, $241_{Tre \rightarrow Ile}$) sólo se han observado en aislados italianos de dorada, mientras que la mutación en el aa$792_{Cys \rightarrow Ser}$ podría ser exclusiva de estas cepas, aunque no se ha podido comparar con los aislados italianos ya que la secuencia disponible en GenBank se corresponde con un fragmento más pequeño.

El aislado Sp939.20, procedente también de sardina, contiene asimismo 24 mutaciones, tres de ellas en la región C-terminal, en los aminoácidos $773_{Val \rightarrow Phe}$, $775_{Asp \rightarrow Glu}$ y $946_{Val \rightarrow Ile}$, que no se observan en las demás secuencias analizadas. Esta última posición aparece también mutada en todos los recombinantes, pero todas ellas presentan una Treonina en lugar de una Isoleucina.

El tercer aislado de sardina, Sp997.21, comparte la misma secuencia aminoacídica que otras cepas recombinantes, como la Ss160.03 o la 573.04.

Por último, el aislado de caballa, Ssc1002.21, presenta 21 mutaciones, de las cuales dos cambios en la región N-terminal (posiciones $5_{Glu \rightarrow Gly}$ y $237_{Ser \rightarrow Arg}$) son exclusivos. Además, es el único aislado recombinante que conserva el aminoácido Alanina, presente en la posición 289 de la cepa parental SGWak97.

Tabla I.10. Cambios aminoacídicos (verde) observados en la proteína RdRp entre los aislados obtenidos en este capítulo (subrayado) y otras cepas recombinantes descritas en nuestro laboratorio, con respecto a la cepa SGWak97. En violeta y contenidos en un recuadro, los exclusivos de cada una de ellas.

aa	SGWak97	Ss160.03	Sa382.17	Sp756.19	Sp939.20	Sp997.21	Ssc1002.21	Sa156.03	Ss573.04	Sa61.05	Sa74.05	Ss1974.08
5	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	**Gly**	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu
41	Val	**Ile**	**Ile**	**Ile**	**Ile**	**Ile**	**Ile**	**Ile**	**Ile**	**Ile**	**Ile**	**Ile**
48	Ile	**Val**	**Val**	**Val**	**Val**	**Val**	**Val**	**Val**	**Val**	**Val**	**Val**	**Val**
212	Cys	Cys	**Arg**	**Arg**	Cys	Cys	Cys	Cys	Cys	Cys	Cys	Cys
218	Phe	**Leu**	**Leu**	**Leu**	**Leu**	**Leu**	**Leu**	**Leu**	**Leu**	**Leu**	**Leu**	**Leu**
223	Met	**Leu**	**Leu**	**Leu**	**Leu**	**Leu**	**Leu**	**Leu**	**Leu**	**Leu**	**Leu**	**Leu**
237	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	**Arg**	Ser	Ser	Ser	Ser	**Gly**

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

aa	SGWak97	Ss160.03	Sa382.17	Sp756.19	Sp939.20	Sp997.21	Ssc1002.21	Sa156.03	Ss573.04	Sa61.05	Sa74.05	Ss1974.08
238	Phe	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr
241	Tre	Tre	Ile	Ile	Tre	Tre	Tre	Tre	Tre	Tre	Tre	Tre
289	Ala	Tre	Tre	Tre	Tre	Tre	Ala	Tre	Tre	Tre	Tre	Tre
414	Glu	Glu	Asp	Asp	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Asp
602	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Lys
773	Val	Val	Val	Val	Phe	Val	Val	Val	Val	Val	Val	Val
775	Asp	Asp	Asp	Asp	Glu	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp
792	Cys	Cys	Ser	Ser	Cys	Cys	Cys	Cys	Cys	Cys	Cys	Cys
817	Asn	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys
853	Tre	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala
908	Ala	Tre	Tre	Tre	Tre	Tre	Tre	Tre	Tre	Tre	Tre	Tre
919	Cys	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg
936	Gly	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp
939	Ser	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro
943	Ser	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro
944	Pro	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser
946	Val	Tre	Tre	Tre	Ile	Tre	Tre	Tre	Tre	Tre	Tre	Tre
954	Tre	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala
955	Pro	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Pro
959	Asp	Hys	Hys	Hys	Hys	Hys	Hys	Hys	Hys	Hys	Hys	Hys
975	Pro	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg
976	Arg	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln

Por otra parte, el análisis de la proteína de la cápside (**Tabla I.11**) reveló que todos los aislados obtenidos en este estudio poseen la mutación en los aminoácidos 247 y 270, descritos por Souto y col. (2015b) como posibles determinantes de virulencia de las cepas recombinantes, y que también están presentes en las cepas recombinantes descritas por Biasini y col. (2022). En detalle, el aislado Sp756.19, posee 7 mutaciones con respecto a la secuencia SJNNV parental, 6 de los cuales son comunes con la cepa de dorada Sa382.17, incluyendo las posiciones 27 ($_{Tre \rightarrow Ile}$) y 298 ($_{Phe \rightarrow Tyr}$). La posición 27 parece

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ser exclusiva de estas dos cepas, mientras que la 298 también está presente en los recombinantes italianos. Además, el aislado Sp756.19 introduce un cambio en el aa $229_{Hys \rightarrow Tyr}$, observado también en el aislado Sp997.21. Este último, presenta en total 8 mutaciones y contiene un cambio exclusivo en la posición $295_{Ala \rightarrow Asp}$. El tercer aislado de sardina, Sp939.20, también presentó dos cambios exclusivos en el extremo C-terminal que afectan a los aa $255_{Ala \rightarrow Val}$ y $293_{Val \rightarrow Gly}$. Finalmente, en el aislado Ssc1002.21 se observaron ocho mutaciones, tres de ellas exclusivas en las posiciones $77_{Lys \rightarrow Glu}$, $136_{Hys \rightarrow Tyr}$ y $237_{Tyr \rightarrow Hys}$.

Tabla I.11. Cambios aminoacídicos (verde) observados en la proteína de la cápside entre los aislados obtenidos en este capítulo (subrayado) y otras cepas recombinantes descritas en nuestro laboratorio, con respecto a la cepa SJNag93. En violeta y contenidos en un recuadro los exclusivos de cada una de ellas.

aa	SJNag93	Ss160.03	Sa382.17	Sp756.19	Sp939.20	Sp997.21	Ssc1002.21	Sa156.03	Ss573.04	Sa61.05	Sa74.05	Ss1974.08
13	Pro	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Pro	Ala	Ala	Ala
20	Ser	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro
27	Tre	Tre	Ile	Ile	Tre	Tre	Tre	Tre	Tre	Tre	Tre	Tre
77	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Glu	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys
79	Val	Ile	Val	Val	Ile	Ile	Ile	Ile	Ile	Val	Val	Val
130	Asp	Asn	Asp	Asp	Asp	Asn	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp
136	Hys	Hys	Hys	Hys	Hys	Hys	Tyr	Hys	Hys	Hys	Hys	Hys
196	Asn	Asn	Asn	Asn	Asn	Asn	Asn	Asn	Asn	Asn	Hys	Asn
229	Hys	Hys	Hys	Tyr	Hys	Tyr	Hys	Hys	Hys	Hys	Hys	Hys
237	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Hys	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr
247	Ala	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser
255	Ala	Ala	Ala	Ala	Val	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala
270	Asn	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser
293	Val	Val	Val	Val	Gly	Val	Val	Val	Ile	Ile	Ile	Val
295	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Asp	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala
298	Phe	Phe	Tyr	Tyr	Phe	Phe	Phe	Phe	Phe	Phe	Phe	Tyr

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.3.5. Infección experimental en lenguado

La infección experimental en lenguado mostró ciertas diferencias en la replicación viral en función de la cepa y la temperatura de incubación. La dosis de VNNV durante la infección, evaluada mediante titulación, fue de entre 10^5-$10^{5,5}$ $TCID_{50}$/ml.

A 18 ºC (**Fig. I.5A**), la replicación de los aislados de sardina Sp756.19 y Sp939.20 mostró un incremento entre los días 7 pi y 21 pi, desde 4,6 × 10^6 y 1,1 × 10^5 copias en el día 7 pi, hasta 2,8 × 10^7 y 5,6× 10^6 en el día 21 pi, respectivamente. Sin embargo, el número de copias de los dos aislados restantes Sp997.21 y Ssc1002.21 descendió de forma significativa (p valor < 0,05) con el progreso del experimento, desde 2 × 10^6 en el día 7 pi, hasta 4,9 × 10^4 y 7,9 × 10^4, respectivamente, en el día 21 pi.

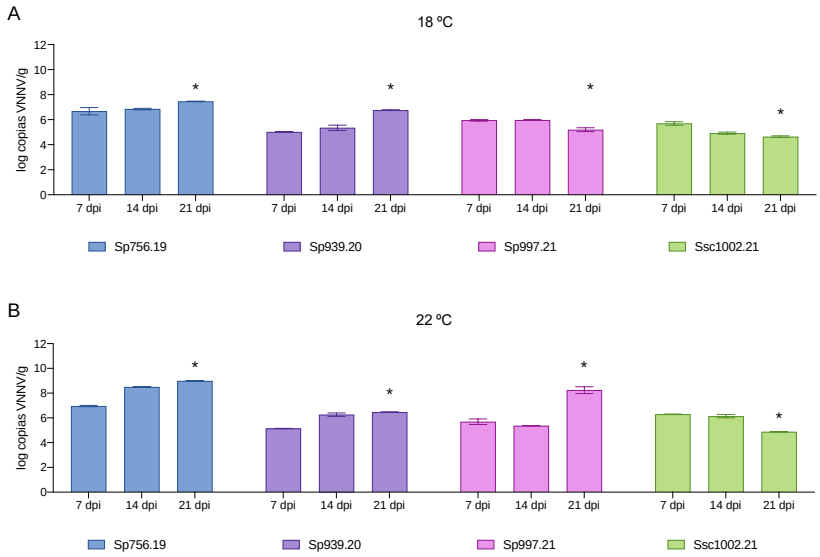


Figura I.5. Cuantificación de la replicación de los aislados obtenidos en este estudio a 18 ºC (**A**) y 22 ºC (**B**), expresada como log copias ARN1/g de pez, en cada punto de muestreo. Los datos representan el promedio de los 6 peces analizados en cada punto (3 peces/tanque) ± SD. Los asteriscos indican diferencias significativas (p valor < 0,05) con respecto a los 7 dpi en cada grupo.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

A 22 ºC (**Fig. I.5B**), todos los aislados mostraron un número de copias en el día 7 pi similar al detectado a 18 ºC. Sin embargo, los aislados Sp756.19 y Sp997.21 mostraron los valores más elevados de replicación, ya que alcanzaron en el día 21 pi 1×10^9 y $1{,}6 \times 10^8$ copias, respectivamente. En el caso del aislado Sp939.20, aunque también se observó una tendencia creciente en el número de copias, ésta fue más moderada, con $3{,}1 \times 10^6$ copias en el día 21 pi. Por último, al igual que ocurrió a 18 ºC, el número de copias de ARN1 del aislado de caballa Ssc1002.21 disminuyó desde $1{,}7 \times 10^6$ hasta $3{,}9 \times 10^4$ al final del experimento.

En todos los peces inoculados con los aislados recombinantes se identificaron signos de ERV desde el día 5 pi, como natación en bucles y reposo boca arriba, aunque no se evidenció una disminución del apetito ni de la ingesta. No se detectó VNNV ni sintomatología en los peces bañados con medio de cultivo L-15.

1.4. Discusión

La aparición de los betanodavirus en la naturaleza data del siglo XIV (He y Teng, 2015), y desde entonces han evolucionado para colonizar nuevas especies y alcanzar una distribución prácticamente mundial, relacionada, de forma estrecha, con los rangos de tolerancia a la temperatura de cada genotipo (Bandín y Souto, 2020). Además, algunos autores sugieren que podría ser un patógeno endémico en determinadas regiones como, por ejemplo, la costa de Argelia (Boukedjouta y col., 2020). Sin embargo, los cambios en la temperatura del agua de mares y océanos, relacionado con el aumento en la temperatura global y el cambio climático, podría favorecer la dispersión del VNNV hacia nuevas localizaciones geográficas.

En los últimos años, diversos brotes de ERV permitieron el aislamiento de cepas recombinantes de VNNV (RGNNV/SJNNV) en la Península Ibérica e Italia (Olveira y col., 2009; Panzarin y col., 2012; Toffan y col., 2017; Volpe y col., 2020), incluyendo la cepa Ss160.03, procedente de lenguado y considerada la cepa recombinante tipo en nuestro laboratorio, y la cepa Sa382.17, obtenida de doradas y utilizada en las infecciones experimentales de los próximos capítulos. Por tanto, nos planteamos realizar una investigación epidemiológica en peces capturados en áreas de pesca del

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Océano Atlántico, con el objetivo de determinar la prevalencia del VNNV en esa zona. Para ello, se analizó un total 1277 individuos pertenecientes a 16 especies, en un período de 3 años.

Este estudio permitió detectar el VNNV en un 1,72 % de los peces analizados, incluyendo ejemplares de lubina, sargo, merluza, sardina, caballa, jurel, lirio y gallo. A excepción del lirio y gallo, la presencia de este patógeno en las restantes especies ya ha sido descrita en estudios epidemiológicos anteriores realizados en el área mediterránea (Italia, Grecia o Turquía), por lo que las cálidas temperaturas que se alcanzan en la zona en los meses de verano favorecen que el principal genotipo detectado sea el RGNNV, y en menor medida el recombinante RGNNV/SJNNV (Banu y col., 2019; Bitchava y col, 2019; Ciulli y col., 2007; Giacopello y col., 2013; Haddad-Boubaker y col., 2014; Kaplan y col., 2022; Panzarin y col., 2012; Johnstone y col., 2022). Sin embargo, nuestros resultados indican que aproximadamente la mitad de los individuos capturados en aguas costeras gallegas que resultaron positivos para el VNNV, contenían virus con genoma recombinante RGNNV/SJNNV y la otra mitad tipo SJNNV, lo que podría estar relacionado con la temperatura promedio del agua (15 ± 1 ºC). De hecho, estudios anteriores realizados por nuestro grupo han demostrado la persistencia de una cepa recombinante en lenguados mantenidos a 16 ºC durante largos períodos de tiempo (Souto y col., 2015c). Además, en este trabajo se ha detectado por primera vez recombinantes RGNNV/SJNNV en sargo, lirio, caballa y merluza, y el genotipo en SJNNV en jurel, gallo, merluza, sardina y lubina. Aunque estos individuos tenían una baja carga de VNNV, se consiguió el aislamiento en cultivo celular, de 4 recombinantes RGNNV/SJNNV a partir de ejemplares de sardina y caballa.

La representación filogenética de ambos segmentos genómicos de estos 4 aislados, incluyendo también las cepas Ss160.03 y Sa382.17, indicó que el clado que contiene el aislado Sp756.19 (obtenido de sardina) y Sa382.17 (obtenido de dorada) divergió del mismo evento de especiación por el que se formaron algunas cepas obtenidas en Italia. Además, la topología del árbol también muestra que se trata de un clado hermano al que contiene los restantes recombinantes obtenidos en este trabajo y los anteriormente descritos por nuestro grupo, incluyendo la cepa de lenguado Ss160.03. Los cuatro

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

recombinantes presentan sustituciones nucleotídicas con respecto a las cepas parentales de los genotipos RGNNV y SJNNV que se traducen en sustituciones en la pauta de lectura de la polimerasa y la proteína de la cápside.

En cuanto a la proteína RdRp, los aislados procedentes de los peces capturados en el Atlántico y las cepas Ss160.03 y Sa382.17, poseen entre 20 y 24 cambios con respecto a la cepa SGWak97. Algunos se incluyen entre las posiciones 1-445, de la región N-terminal, que regula la adaptación a la temperatura (Hata y col., 2010; Panzarin y col., 2014; Souto y col., 2019). En esta región, los aislados de este trabajo y las cepas Ss160.03 y Sa382.17 tienen en común mutaciones en las posiciones 41, 48, 218, 223, 238 y 289. Sin embargo, el aislado Sp756.19 y la cepa Sa382.17 comparten cambios en las posiciones 212, 241 y 414, que están ausentes en los demás recombinantes. De ellas, la posición 241 se encuentra formando parte de un gran dominio transmembrana (TMD) que dirige la RdRp a la mitocondria para la formación del complejo de replicación (Guo y col., 2004; Hata y col., 2010; Panzarin y col., 2014), ya que los virus (+)ARN adhieren la polimerasa y el genoma a la membrana de los orgánulos celulares, para llevar a cabo dicho proceso (Panzarin y col., 2014; Salonen y col., 2004). Algunos estudios sugieren que este complejo está formado por invaginaciones en la membrana mitocondrial, en las que se localiza el ARN y las proteínas necesarias para la expresión del virus (Unchwaniwala y col., 2021), como es el caso de los virus Greasy Grouper NNV y Atlantic Halibut NNV (Guo y col., 2004; Mézeth y col., 2007). Por tanto, la mutación en la posición 241 observada en el aislado Sp756.19 podría favorecer su replicación frente a los demás aislados que mantienen el aminoácido de la cepa parental, lo que se confirma por la elevada carga viral en la infección experimental en lenguado a las dos temperaturas ensayadas en comparación con los niveles obtenidos en las otras cepas. Por otra parte, el cambio en la posición 237 observada únicamente en el aislado Ssc1002.21, podría afectar a la formación del complejo de replicación, explicando así la baja eficiencia de replicación en lenguado.

Con respecto a la proteína de la cápside, se observó una elevada homología entre todas las secuencias analizadas, aunque se detectaron entre 6 y 8 cambios aminoacídicos con respecto a la cepa parental SJNag93. En la región N-terminal, el aislado Sp756.19 comparte el cambio en la posición 27

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

(Thr → Ile) con la cepa Sa382.17 de dorada y otro en la posición 298 presente hasta la fecha únicamente en aislados de dorada, mientras que el aislado Ssc1002.21 posee cambios en las posiciones 77 y 136, que no se detectan en las demás recombinantes. Las mutaciones en las posiciones 27 y 77 se localizan en la región responsable de la neutralización de la carga negativa del ARN para su empaquetamiento, tal y como se ha visto en Malabaricus Grouper Nervous Necrosis Virus (MGNNV; Tang y col., 2002), el nodavirus Macrobranchium rosembergii (MrNV; Goh y col., 2014) y el alfanodavirus Flock House Virus (FHV; Marshall y Schneemann, 2001).

A partir del residuo 217 hasta el extremo C-terminal, los residuos se localizan en la parte externa de la cápside, responsable de la interacción con las células del huésped. Por este motivo, las mutaciones observadas en esta región podrían desempeñar un papel importante en la virulencia. Las aislados de sardina y caballa comparten la mayoría de los cambios presentes en la cepa Ss160.03 altamente virulenta para lenguado, incluyendo los aa 247 y 270, cuyo papel en la virulencia ha sido descrito anteriormente (Labella y col., 2018; Souto y col., 2015b, Moreno y col., 2019), y que también están presentes en numerosos recombinantes aislados en Italia (Biasini y col., 2022). Además, las mutaciones en las posiciones 293 (aislado Sp939.20), y 298 (aislados Sa382.17 y Sp756.19), también se observan en diversos aislados recombinantes obtenidos de dorada en Italia (Biasini y col., 2022). De hecho, estos autores indican que los cambios en la región comprendida entre los aa 291-302, rango en el que se encuentra el aa 295 del aislado Sp997.21, podrían afectar a la interacción de la proteína de la cápside con los receptores celulares del huésped ya que se traducen en cambios fisicoquímicos en la proteína.

En resumen, hemos detectado la presencia del VNNV (genotipo SJNNV y recombinante RGNNV/SJNNV) en un pequeño número peces capturados en áreas de pesca de la costa gallega. Sin embargo, en algunos de estos peces la carga viral fue suficientemente alta como para permitir el aislamiento de 4 cepas recombinantes que poseen cambios en el ORF de la proteína polimerasa y de la cápside que podrían afectar a la eficiencia en la replicación del virus o al reconocimiento de los receptores celulares del nuevo huésped.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

CAPÍTULO II. PAPEL DEL ZOOPLANCTON EN LA TRANSMISIÓN DEL VNNV: INFECCIÓN DE LARVAS DE LUBINA MEDIANTE ROTÍFEROS

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

CAPÍTULO II. PAPEL DE ZOOPLANCTON EN LA TRANSMISIÓN DEL VNNV: INFECCIÓN DE LARVAS DE LUBINA MEDIANTE ROTÍFEROS

2.1. Introducción

La transmisión horizontal del VNNV en las instalaciones de acuicultura puede ocurrir por contacto directo entre animales infectados y animales sanos susceptibles o a través de la columna de agua. Además, este patógeno también ha sido detectado en invertebrados marinos, incluyendo algunas especies de zooplancton, como el rotífero *Brachionus plicatilis* o el crustáceo *Artemia salina*, que se utilizan habitualmente como alimento inicial para las larvas (Panzarin y col., 2012; Skliris y Richards, 1998).

Los rotíferos (Filo *Rotifera*) se encuentran entre el zooplancton más comúnmente utilizado para la alimentación de las larvas de peces en la acuicultura marina ya que su composición bioquímica es adecuada para cumplir con los estrictos requerimientos nutricionales de las primeras fases de desarrollo larvario (Dhont y col., 2013; Eryalçın 2018, 2019). Habitualmente, se administran hasta que las larvas alcanzan aproximadamente una semana de vida, aunque la duración depende de la especie a alimentar.

Se trata de microorganismos con morfología cilíndrica, en la mayoría de las especies, y cuyo cuerpo se divide en cabeza (donde se encuentra la corona), cuello (solo presente en algunas especies), tronco y patas (ausente en especies planctónicas). La corona suele presentar dos anillos ciliados responsables de la formación de corrientes de agua para la locomoción y alimentación. El

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

alimento se introduce mediante filtración y es procesado en el órgano masticatorio o *mástax* hacia el estómago. Presentan una cubierta corporal externa compuesta, entre otros, por proteínas tipo queratina que en algunas especies puede ser flexible o presentar pequeñas proyecciones y/o secreciones corporales en las que se pueden incrustar microorganismos o restos de materia orgánica. En cuanto a la organización corporal, contienen una cavidad perivisceral denominada pseudoceloma, que baña músculos, nervios y los órganos reproductores, digestivos y protonefridiales. No poseen sistema circulatorio ni respiratorio, y el sistema nervioso consiste en un único ganglio cerebral, también denominado cerebro, localizado de forma dorsal al *mástax*, pequeños ganglios en *mástax* y patas, y órganos sensoriales (Wallace y col. 2015).

A pesar de los innegables beneficios del uso de los rotíferos como fuente de biomoléculas esenciales para las larvas de peces, estos también pueden actuar como vectores mecánicos de patógenos hacia los cultivos sanos, transmitiéndoles parásitos, bacterias y/o virus, que acumulan en su interior debido a su naturaleza filtradora (Avila-Villa y col., 2011; Marcogliese, 2002; Skliris y Richards, 1998; Valverde y col., 2019). Por tanto, el principal objetivo de este capítulo es evaluar el papel de los rotíferos en la transmisión del VNNV a las larvas de lubina.

2.2. Material y métodos

2.2.1. Cepa viral: propagación y titulación

En este ensayo se utilizó la cepa 283.2009, de genotipo RGNNV y aislada en Italia a partir de un brote de ERV que afectó a cultivos de lubina, que presentaban una mortalidad masiva (Panzarin y col., 2012). La propagación y titulación viral se realizó en células E-11 de acuerdo con la metodología descrita en los apartados 1.2.5 y 1.2.8, respectivamente.

2.2.2. Inoculación del VNNV en cultivos de rotíferos

Los rotíferos (*B. plicatilis*) se mantuvieron en cultivo continuo en tanques circulares opacos de 80 l con agua de mar artificial (salinidad 35 g/l) a 27 ± 1 ºC y aireación. Los cultivos se alimentaron diariamente con un producto comercial denominado NannoStar (AlgaSpring), compuesto por un

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

concentrado de la microalga del género *Nannochloropsis* y que posee una composición adecuada para el correcto crecimiento del invertebrado.

La inoculación de los rotíferos se realizó mediante inmersión con la cepa 283.2009 (10^5 $TCID_{50}$/ml) en un tanque de 20 l durante 24 h. A continuación, los rotíferos se recogieron por filtración a través de una malla, se lavaron con agua corriente para eliminar el virus adherido a la superficie corporal del animal, y se cultivaron durante otros 6 días en agua libre de virus en las condiciones descritas anteriormente. Se recogieron muestras (200 mg) a las 6, 12, 24, 48, 72 y 144 horas post-inoculación (hpi) y se lavaron de forma previa a los análisis virológicos. Como control se utilizó un lote de rotíferos bañado con medio de cultivo celular, que se manipuló de igual forma que el grupo infectado.

Los rotíferos (grupo inoculado y control) se analizaron mediante fluorescencia indirecta (IFA) a las 6 y 24 hpi, y mediante tinción inmunohistoquímica (IHC) a las 6, 24 y 48 hpi, mientras que la cuantificación de carga viral mediante RT-qPCR y el aislamiento del virus en cultivo celular se realizó en todos los puntos de muestreo, como se describirá a continuación. También se recogió una alícuota de 20 ml de agua del tanque de inoculación en los primeros 10 minutos para confirmar la dosis de VNNV.

2.2.3. Infección experimental de larvas de lubina

Las larvas de lubina (n = 60.000) de 0 días post eclosión (dpe) se adquirieron en una piscifactoría comercial libre de VNNV y se alojaron en las instalaciones del acuario experimental del Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSVe, Italia). Se distribuyeron de forma aleatoria en tres tanques opacos de 300 l (20.000 larvas por tanque), con agua salada artificial de salinidad 35 g/l, que se redujo de forma progresiva a 27 g/l; la temperatura se mantuvo a 19 ± 1 °C y el oxígeno a 6 ± 0,5 ppm. A su llegada, se tomó una muestra de 10 mg que se analizó y resultó negativa para los patógenos más comunes en lubina, incluyendo bacterias y betanodavirus. Las larvas se mantuvieron en oscuridad hasta la adsorción del saco vitelino, y posteriormente se estableció un fotoperiodo artificial de 7 h de luz, a 18 ± 1 ºC. Además, durante los 3 días previos a la infección se alimentaron con

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

rotíferos enriquecidos con NannoStar para asegurar la adecuada ingesta de alimento.

La infección experimental se realizó a los 12 días post eclosión alimentando a las larvas de un tanque (n = 20.000) con una única dosis de rotíferos (aproximadamente 100 rotíferos/larva) previamente inoculados con la cepa 283.2009 a una concentración de 10^6 $TCID_{50}$/ml durante 18 h. Antes de su administración como alimento a las larvas, los rotíferos portadores de VNNV se lavaron como se ha descrito anteriormente. Con fines comparativos, las larvas restantes se sometieron a infección por baño durante 1 h con la misma cepa de VNNV a una concentración de 10^5 $TCID_{50}$/ml (control positivo), o se trataron con medio de cultivo (control negativo). Los tanques se observaron diariamente para detectar signos de ERV en las larvas y se tomaron muestras diarias de individuos para los análisis virológicos, incluyendo cuantificación de carga viral mediante RT-qPCR y titulación en cultivo celular, y tinción IHC.

2.2.4. Procesado de las muestras para cuantificación de carga viral mediante titulación

Las muestras de rotíferos (200 mg) y larvas (40 larvas/punto de muestreo) se homogeneizaron manualmente en tubos eppendorf con arena de cuarzo estéril y, a continuación, se diluyeron en 500 y 330 µl de MEM, respectivamente, suplementado con una solución antibiótica y antimicótica al 1%, compuesta por 10.000 UI/ml de penicilina G, 10 mg/ml de sulfato de estreptomicina, 25 µg/ml de anfotericina B, 0 4% de solución de kanamicina 50 mg/ml y 1% de solución de sulfato de polimixina B 50 mg/ml (Merck KGaA). La alícuota de agua se filtró por una membrana de 0,45 µm y se incubó hasta el día siguiente con la solución de antibióticos y antifúngicos descrita anteriormente.

Todas las muestras se titularon utilizando monocapas semiconfluentes de la línea celular SSN-1 de acuerdo con el procedimiento descrito en el apartado 1.2.8.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

2.2.5. Procesado de las muestras para cuantificación de carga viral mediante RT-qPCR

2.2.5.1. Extracción de ARN

El ARN total de las muestras se extrajo utilizando el kit RNeasy Mini Kit (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. En el caso de rotíferos y larvas, se analizaron tres réplicas biológicas (20 mg de rotíferos y 5 larvas/réplica, respectivamente), mientras que sólo se analizó una muestra del agua del tanque en que se inocularon los rotíferos. Los tejidos se homogenizaron con bolas de acero inoxidable en un aparato TissueLyser II (Qiagen), añadiendo 650 µl de tampón de lisis (RLT) suplementado con 1 % de β-mercaptoetanol y 2 M de ditiotreitol (DTT), y el mismo volumen de etanol 70 % en agua libre de nucleasas. A la muestra de agua, se añadió directamente el tampón RLT y el etanol 70%. Tras una incubación de 1 min, la muestra se transfirió a una columna de extracción, se centrifugó a 10.000 × g durante 1 min, y se descartó el volumen eluído. A continuación, se realizó un lavado con el tampón de lavado RW1 y se centrifugó de la misma manera. La membrana se incubó durante 15 min con una solución de DNAsas y se repitió el lavado con el tampón RW1. Se realizaron dos lavados consecutivos con tampón de lavado RPE (500 µl), centrifugando entre cada lavado como se describió anteriormente, excepto en el último, que se dejó durante 2 min para eliminar todos los restos del tampón de lavado de la membrana. Finalmente, la columna de extracción se transfirió a un vial eppendorf y se eluyó el ARN en 70 µl de agua libre de nucleasas.

La integridad del ARN se evaluó en el bioanalizador Agilent 2100 utilizando el kit Agilent ARN 6000 Nano (Agilent Technologies). Valores de RIN (del inglés *RNA integrity number*) en torno a 8-10 son indicativos de que el ARN extraído mantiene la integridad. También se estimó la concentración de ARN con el sistema Qubit ™ ARN BR Assay en un fluorómetro Qubit ™ 4 (ThermoFisher Scientific). La cantidad de ARN de las muestras de rotíferos y agua se normalizó en agua de grado molecular, en función del peso de la muestra y del volumen inicial, respectivamente, asumiendo un rendimiento de extracción de ARN del 100%. La normalización del ARN de las larvas se realizó en base a la concentración del ARN total extraído.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

2.2.5.2. Transcripción inversa (RT-PCR)

La síntesis de ADNc se realizó utilizando un kit de transcriptasa inversa SuperScript™ III (Invitrogen de Thermofisher Scientific), en un termociclador MyCycler™ (Bio-Rad), partiendo de una concentración de ARN normalizada equivalente a 400 µg de rotíferos, 4 µl de agua y 80 ng de ARN total de larvas. La reacción se realizó utilizando 50 pmol de hexámeros aleatorios, 10 mmol de nucleótidos trifosfatados (dNTP), 0,05 M de ditrioteitol (DTT) y 200U/µl de la enzima *SuperScritpt III Reverse Transcriptase*, en un volumen final de 20 µl. El perfil térmico consistió en una incubación inicial durante 5 min a 65 ºC, seguido de una incubación en hielo durante al menos 5 min, y después 5 min a 25 ºC, 60 min a 50 ºC y 15 min a 70 ºC.

2.2.5.3. PCR cuantitativa (qPCR)

Las reacciones de RT-qPCR se realizaron en un termociclador CFX96™ Real Time System (BioRad), en un volumen final de 25 µl utilizando la enzima SsoFast™ EvaGreen ® Supermix (BioRad), 5 µl del ADNc obtenido en el apartado anterior y 0,5 M de los cebadores ARN1_FOR 5'-ATCACTGACGGTTCACTACCG-3' y ARN1_REV 5'-CATACATGGTATCGGTTGTAGTTCC-3'. El perfil térmico seguido se describió en el apartado 1.2.4.3. Para la cuantificación de carga viral, se utilizó un ARN1 sintético, producido siguiendo la metodología descrita por Toffan y colaboradores (2021). El número de copias genómicas se expresó con respecto a 100 µg de rotíferos, 1 µl de agua o 20 ng de ARN total de larvas.

2.2.6. Ensayo de fluorescencia indirecta (IFA) en rotíferos

Las muestras de rotíferos (6 y 24 hpi) se conservaron y fijaron en formol tamponado al 4% (WVR International Srl) a 4 ºC hasta su uso. Antes de realizar la IFA, las muestras se lavaron con solución de lavado formada por PBS-Tween (0,05%) y se bloquearon con una solución de seroalbúmina bovina (BSA; del inglés, *bovine serum albumin*) al 0,05% (p/v) durante 30 minutos a 37 ºC. A continuación, los rotíferos se incubaron con un suero policlonal anti-RGNNV (1:1000) obtenido en el laboratorio (pAb 283) (Panzarin y col., 2016) y, a continuación, con el anticuerpo secundario de cabra anti *rabbit*-IgG conjugado con FITC (1:100) (Merck). Ambas

USC UNIVERSIDADE SANTIAGO DE COMPOSTELA

incubaciones se realizaron durante 1 h a 37 ºC. Tras cada uno de los pasos (bloqueo e incubaciones con los anticuerpos primario y secundario), los individuos se lavaron 3 veces utilizando la solución de lavado. La fluorescencia se observó en un microscopio Zeiss Axioskop equipado con una Axiocam MRC 5.

2.2.7. Tinción inmunohistoquímica (IHC) de rotíferos y larvas

Las muestras de larvas de lubina (n = 20) y de rotíferos se fijaron en formol tamponado al 10% y se procesaron por el Departamento de Histopatología del IZSVe, para realizar un examen histopatológico y de IHC, siguiendo el procedimiento descrito por Toffan y colaboradores (2021). La presencia de antígenos de betanodavirus se caracteriza por la visualización de los inmunoprecipitados de color rojo brillante.

2.2.8. Análisis estadístico

El análisis de los datos se realizó utilizando los estadísticos descritos en el apartado 1.2.9.

2.3. Resultados

2.3.1. Acumulación de VNNV en el interior de los rotíferos

Los rotíferos inoculados mostraron una morfología normal (**Fig. II.1A**) y no se observó ningún comportamiento anormal ni afectación de su capacidad natatoria.

2.3.1.1. IFA

Esta técnica permitió observar una ligera fluorescencia principalmente en la corona de los individuos inoculados con el VNNV a las 6 hpi (**Fig. II.1B**), y una señal más intensa a las 24 hpi (**Fig. II.1C**) tanto en la corona como en el pseudoceloma y en la cutícula que recubre la parte externa del rotífero.

No se observó señal inmunofluorescente en los siguientes puntos de muestreo, ni en los huevos de los rotíferos (datos no mostrados) ni en el grupo control (**Fig. II.1D**).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

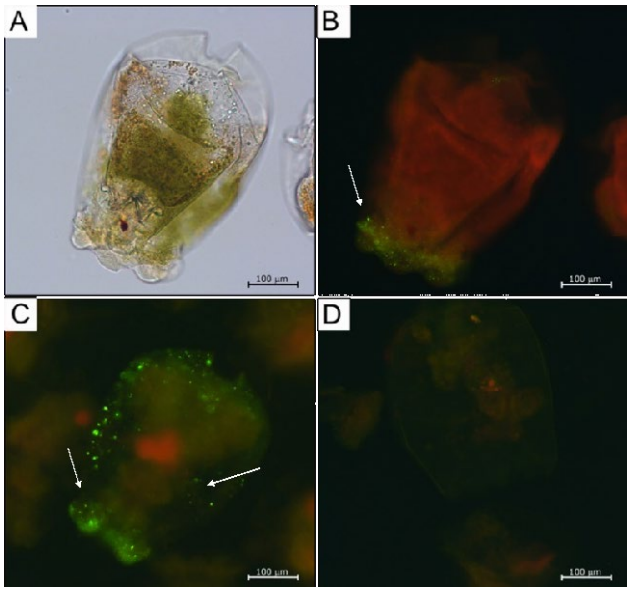


Figura II.1. Imágenes de IFA de los rotíferos inoculados con VNNV y control. Los rotíferos portadores del virus mostraron una apariencia normal a las 6 hpi bajo la luz del microscopio **(A)** y una ligera fluorescencia en la corona (flecha) con luz UV **(B)**. A las 24 hpi se observó una fluorescencia intensa en la corona y en el pseudoceloma (flecha; **C**). El control negativo no mostró fluorescencia (**D**).

2.3.1.2. Inmunohistoquímica

La tinción inmunohistoquímica reveló la presencia de rotíferos positivos al VNNV a las 6, 24 y 48 hpi.

Al inicio de la inoculación (6 hpi), los rotíferos evidenciaron la presencia de algunos inmunoprecipitados del VNNV en el lumen del estómago y del intestino (**Fig. II.2A**), mientras que a las 24 (**Fig. II.2B**) y 48 hpi (**Fig. II.2C**) se apreció un número mayor de inmunoprecipitados en el pseudoceloma y en la cara interna de la cutícula. No se observó señal de IHC en los rotíferos del grupo control (**Fig. II.2D**).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

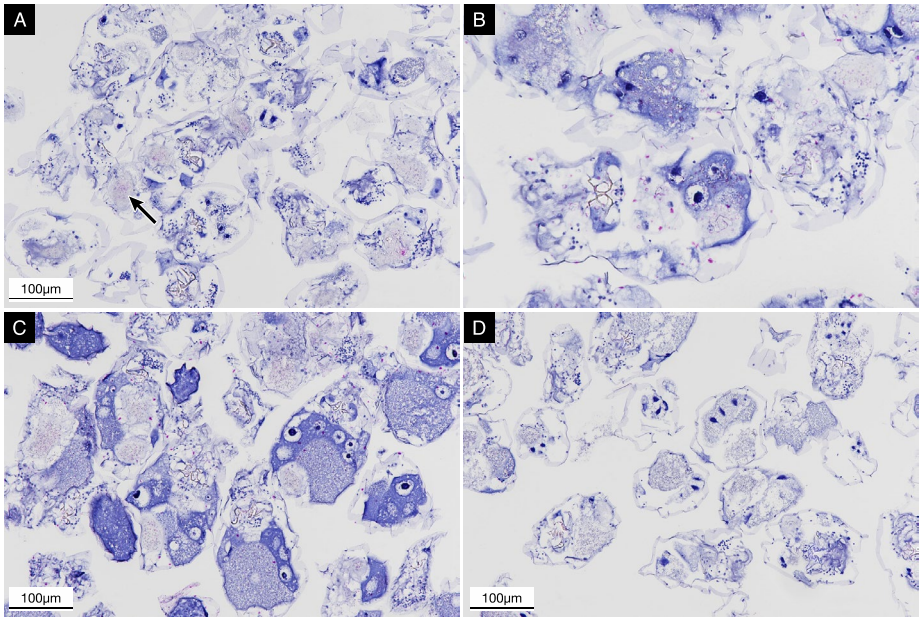


Figura II.2. IHC de los rotíferos a las 6 **(A)**, 24 **(B)** y 48 hpi **(C)**. Se observan inmunoprecipitados en el estómago e intestino (flechas, A), y en el esófago (flechas, B), el pseudoceloma (flechas, C) y la cara interna de la cutícula (punta de flecha, B, C). La IHC en el grupo control evidencia la ausencia de partículas virales (D).

2.3.1.3. Carga viral: $TCID_{50}$ y número de copias de ARN1

La cuantificación de la carga viral en los rotíferos se evaluó mediante titulación en cultivo celular y RT-qPCR (**Fig. II.3**). A aquellas muestras que no desarrollaron ECP durante el período de titulación o no fueron detectadas por RT-qPCR, se les asignó un valor arbitrario de 0 $TCID_{50}$/ml y 0 copias.

Los valores más altos, tanto de partículas de VNNV viables como de copias genómicas, se registraron a las 6 hpi ($3{,}5 \times 10^4$ $TCID_{50}$/ml y $2{,}7 \times 10^4$ copias, respectivamente). A las 12 hpi, se observó un descenso de 1 log (2×10^3 $TCID_{50}$/ml y $4{,}2 \times 10^3$ copias) y la carga se mantuvo casi estable hasta las 24 hpi. A continuación, los rotíferos se filtraron, se lavaron con agua corriente y se cultivaron en agua libre de virus. Las muestras tomadas en los siguientes puntos indican una disminución de la carga viral de forma rápida y continua. A las 48 hpi se registró un título bajo ($1{,}1 \times 10^2$ $TCID_{50}$/ml y 5×10^1 copias),

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

a las 72 h el número de copias había descendido 0,5 log y no se recuperaron partículas viables y, a las 144 hpi, no fue posible detectar el virus por ninguna de las técnicas usadas.

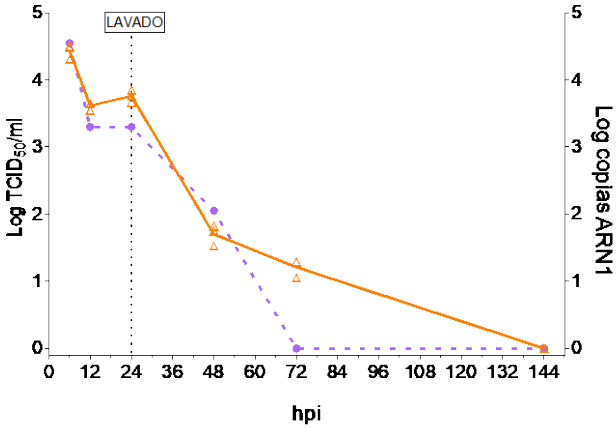


Figura II.3. Cinética de infección por el VNNV en los rotíferos. Los valores individuales se representan como círculos violeta ($TCID_{50}$/ml) y triángulos naranja (log copias ARN1). La línea vertical muestra el momento en que los rotíferos se lavaron y se cultivaron en agua libre de virus.

La muestra de agua tomada del tanque de inoculación a los 10 min pi mostró valores de $6{,}3 \times 10^4$ $TCID_{50}$/ml y $1{,}2 \times 10^5$ copias ARN1/µl, confirmando la dosis de VNNV utilizada.

2.3.2. Infección de las larvas

En el momento de alimentar a las larvas de lubina, los rotíferos contenían una carga viral de $3{,}5 \times 10^4$ $TCID_{50}$/ml ($1{,}8 \times 10^4$ copias ARN1) mientras que en el agua de la infección por baño de las larvas, se cuantificó una carga de $6{,}3 \times 10^4$ $TCID_{50}$/ml ($4{,}3 \times 10^4$ copias ARN1/µl).

Los signos de ERV, incluyendo natación errática en círculos y reposo boca arriba, se visualizaron en el tanque infectado por la vía oral en el día 19 pi, y ningún individuo sobrevivió tras 23 dpi. En la infección por baño, esta sintomatología se detectó más temprano, a partir del día 7 pi, y ningún pez sobrevivió más allá del día 12 pi. Aunque se detectaron algunas muertes en

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

las larvas control a lo largo del experimento, el número fue bajo y no se observaron signos de patología.

2.3.2.1. Cuantificación de carga viral mediante titulación

Durante los primeros 5 días en la infección por la ruta oral, no se detectaron partículas viables del VNNV en las larvas de lubina, por lo que se asignó un valor de 0 $TCID_{50}$/ml (**Fig. II.4**). A partir de ese día, la carga viral expresada como $TCID_{50}$ mostró ciertas oscilaciones hasta el día 12 pi. Sin embargo, a partir del día 13 pi, el título aumentó progresivamente hasta la aparición de los signos clínicos en el día 19 pi, alcanzando un valor máximo de $1{,}12 \times 10^8$ $TCID_{50}$/ml. A continuación, la carga viral se mantuvo en valores similares hasta el final del experimento, aunque con ligeras variaciones ($6{,}3 \times 10^7 – 6{,}3 \times 10^8$ $TCID_{50}$/ml).

En las larvas infectadas mediante inmersión, el número de partículas viables detectadas aumentó con el tiempo desde 2×10^2 $TCID_{50}$/ml en el día 1 pi hasta $1{,}1 \times 10^{10}$ $TCID_{50}$/ml en el día 9 pi. Entre los días 9 y 12 dpi, el título viral se mantuvo en valores muy altos ($6{,}3 \times 10^7$ y $3{,}5 \times 10^8$ $TCID_{50}$/ml).

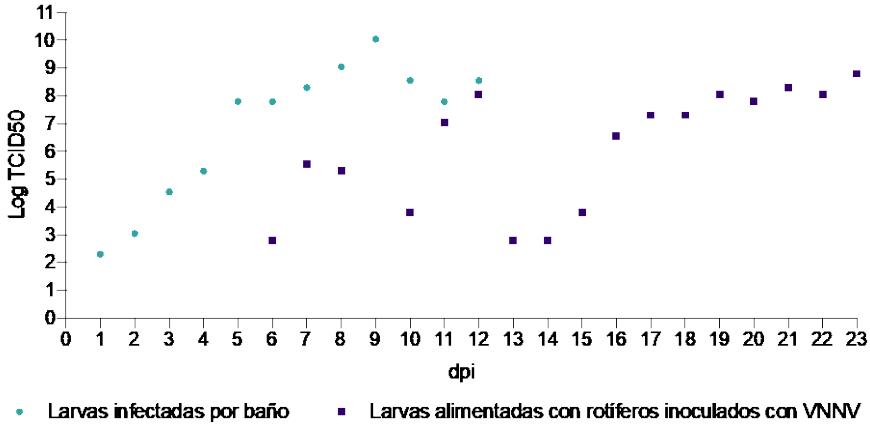


Figura II.4. Título viral obtenido en las larvas infectadas por baño (círculo azul) y por vía oral utilizando rotíferos inoculados con VNNV (cuadrado, violeta).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

2.3.2.2. Cuantificación de carga viral mediante RT-qPCR

La cuantificación del número de copias de ARN1 se realizó por triplicado en grupos de 5 larvas hasta el final del experimento (12 dpi) en el grupo infectado mediante inmersión y 23 dpi en las larvas alimentadas con rotíferos inoculados con VNNV (**Fig. II.5**).

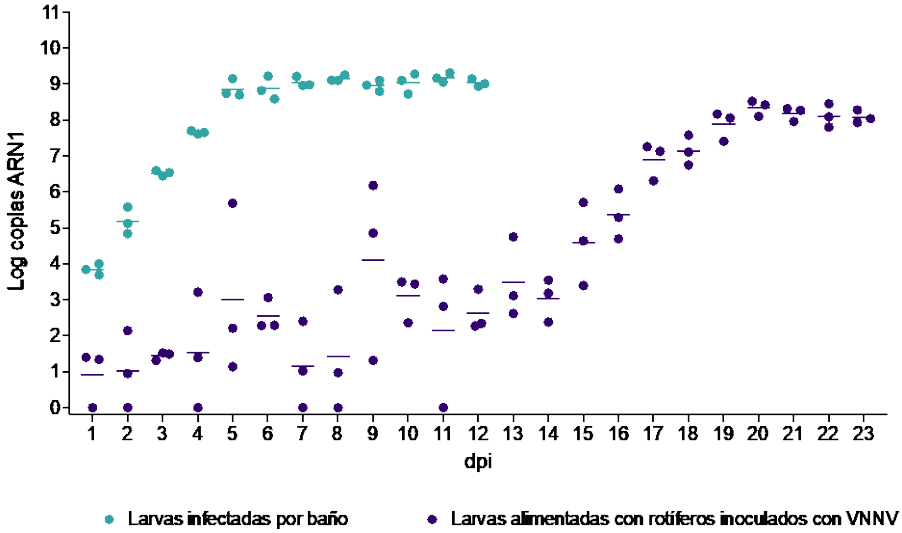


Figura II.5. Cuantificación de carga viral mediante RT-qPCR en las larvas infectadas por baño (círculo, azul) y las alimentadas con rotíferos inoculados con VNNV (cuadrado, violeta). La línea horizontal en cada punto de muestreo refleja el promedio de las 3 réplicas biológicas analizadas.

Las larvas infectadas mediante la ruta oral mostraron una carga viral promedio inferior a 10^2 copias hasta el día 8 pi, aunque en los días 5 y 6 pi, se observó un ligero aumento hasta 1×10^3 (3,01 log) y $3{,}5\times 10^2$ (2,54 log), respectivamente. Las réplicas biológicas analizadas en cada punto de muestreo mostraron una fuerte heterogeneidad, con valores de desviación estándar (SD) superiores a 1, y que llegaron incluso a alcanzar la cifra de 2,51 en el día 9 pi. A partir de ese día se observó un aumento del número de copias genómicas, aunque con algunas oscilaciones hasta el día 14 pi. Entre los días 14 y 20 pi, la carga viral mostró una tendencia creciente (8,35 ± 0,22), mientras que no fue hasta el día 17 pi que la SD se redujo entre réplicas. A

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

partir de ese momento, el número de copias de ARN viral se mantuvo en valores similares hasta el final del experimento.

Las larvas infectadas mediante inmersión mostraron valores elevados a partir de 1 dpi (3,84 log ± 0,15), con poca variación entre las réplicas biológicas de cada punto de muestreo (**Fig. II.5**). El número de copias genómicas del VNNV aumentó regularmente hasta el día 5 pi (8,87 log ± 0,25) y, a continuación, la carga viral promedio de las réplicas se mantuvo en valores similares.

No se observaron diferencias significativas en la carga viral final entre ambas rutas de infección ($p<0,05$).

2.3.2.3. Análisis histológico y tinción IHC

En las larvas infectadas por vía oral, se detectó la presencia de inmunoprecipitados de VNNV por primera vez en el día 8 pi en el encéfalo de un solo individuo (1/13 larvas). En el día 9 pi, se observaron inmunoprecipitados intensos en el encéfalo y la retina, acompañados de una leve vacuolización, también en un único individuo (1/7 larvas) (**Fig. II.6B**). Entre los días 9 y 15 no se observaron individuos positivos a la IHC, mientras que a partir del día 16 pi se produjo un incremento progresivo en la prevalencia de larvas positivas (**Fig. II.6C**). A partir del día 20 pi, todos los individuos analizados mostraron un elevado número de inmunoprecipitados en el tejido nervioso.

Por otra parte, el análisis histológico de los tejidos nerviosos larvarios evidenció la vacuolización del encéfalo y la médula, especialmente a partir del día 16 pi, aunque también se detectó en un único individuo en el día 9 pi. En cuando a la retina, la presencia de vacuolas se retrasó con respecto al encéfalo, y no se detectaron hasta el día 20 pi (**Fig. II.6E; Tabla II.1**).

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

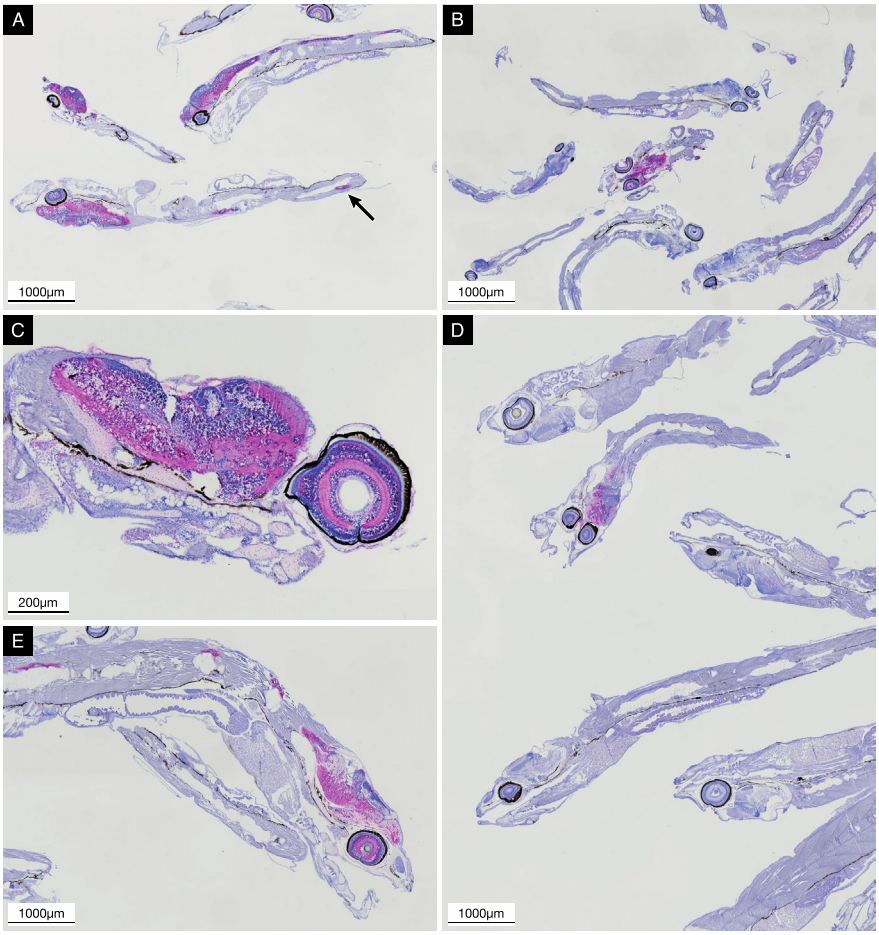


Figura II.6. IHC de las larvas de lubina infectadas mediante baño (**A**: 9 dpi; **C**: 10 dpi) y alimentadas con rotíferos inoculados con VNNV (**B**: 9 dpi; **D**: 17 dpi; **E**: 21 dpi) en diferentes puntos de muestreo. Las puntas de flecha indican la presencia de inmunoprecipitados en la retina. Las flechas muestran señal IHC en el encéfalo y la médula espinal.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla II.1. Resultados de IHC y del análisis histológico del SNC y la retina de las larvas de lubina alimentadas con rotíferos inoculados con VNNV.

dpi	Larvas (n)	% IHC + SNC	% vacuolas SNC	Retinas (n)	% IHC + retina	% Vacuolas retinas
1	5	0,0	0,0	5	0,0	0,0
2	10	0,0	0,0	10	0,0	0,0
3	9	0,0	0,0	9	0,0	0,0
4	8	0,0	0,0	8	0,0	0,0
5	14	0,0	0,0	14	0,0	0,0
6	9	0,0	0,0	9	0,0	0,0
7	8	0,0	0,0	8	0,0	0,0
8	13	7,7	0,0	13	0,0	0,0
9	7	14,3	14,3	7	14,3	14,3
10	7	0,0	0,0	7	0,0	0,0
11	6	0,0	0,0	6	0,0	0,0
12	12	0,0	0,0	12	0,0	0,0
13	9	0,0	0,0	9	0,0	0,0
14	12	0,0	0,0	12	0,0	0,0
15	10	10,0	0,0	10	0,0	0,0
16	13	23,1	15,4	13	0,0	0,0
17	15	40,0	6,7	15	6,7	0,0
18	7	57,1	14,3	7	14,3	0,0
19	12	91,7	50,0	7	85,7	0,0
20	11	100,0	81,8	11	90,9	9,1
21	12	100,0	100,0	12	91,7	25,0
22	7	100,0	100,0	7	100,0	0,0

En las larvas infectadas mediante baño, la tinción IHC reveló la presencia de inmunoprecipitados en el sistema nervioso central (SNC) a partir de los 3 dpi, con un rápido aumento de la intensidad y la prevalencia. En el día 5 pi, el 100 % de las larvas analizadas resultaron positivas, coincidiendo con la primera detección de inmunoprecipitados en la retina. En este órgano, se alcanzó una prevalencia de precipitados de VNNV del 100 % en el día 7 pi (**Fig. II.6a; Tabla II.2)**. En estos individuos, la vacuolización del SNC fue notable a partir de los 6 dpi, y dos días después (8 dpi) en la retina (**Fig II.6C**).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Las larvas del grupo control proporcionaron un resultado negativo al análisis mediante IHC.

Tabla II.2. Resultados de la tinción IHC y el análisis histológico del SNC y la retina de las larvas de lubina infectadas mediante baño por el VNNV.

dpi	Larvas (n)	% IHC + SNC	% vacuolas SNC	Retinas (n)	% IHC + retina	% Vacuolas retinas
1	11	0,0	0,0	10	0,0	0,0
2	13	0,0	0,0	10	0,0	0,0
3	10	20,0	0,0	9	0,0	0,0
4	11	90,9	0,0	11	0,0	0,0
5	14	100,0	0,0	9	44,4	0,0
6	14	100,0	21,4	14	85,7	0,0
7	14	100,0	64,3	12	100,0	0,0
8	16	100,0	87,5	10	100,0	20,0
9	16	100,0	93,8	12	100,0	8,3
10	16	100,0	81,3	12	100,0	33,3
11	8	100,0	87,5	4	100,0	75,0
12	15	100,0	100,0	10	100,0	40,0

2.4. Discusión

La introducción del VNNV en piscifactorías marinas de todo el mundo supone una seria amenaza para el cultivo de larvas y juveniles de peces. Por tanto, es imprescindible identificar y evaluar las posibles vías de entrada de este patógeno en las plantas de acuicultura, incluyendo el alimento vivo utilizado para alimentar las fases larvarias compuesto, fundamentalmente, por invertebrados marinos formadores del zooplancton, como el rotífero *B. plicatilis* y el crustáceo *Artemia* sp.

La transmisión de patógenos mediante la ruta oral ha sido demostrada en numerosos estudios publicados con anterioridad. Ejemplo de ello es la alimentación de rodaballo con rotíferos portadores de bacterias, que dio lugar a la detección de esa población bacteriana en el tracto digestivo del pez (Nicolas y col., 1989). También se ha descrito que la composición de la microbiota de estos invertebrados es similar a la detectada en el tracto

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

digestivo de la dorada (Turgay y col., 2020). En cuanto a los virus, se ha demostrado la transmisión del virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV; del inglés "*White Spot Syndrome Virus"*) al cangrejo de río (*Procambarus clarkii*) y a especies de langostinos como *Penaeus monodon* y *Fenneropenaeus chinensis*, a través de la alimentación con rotíferos portadores (Corre y col., 2012; Yan y col., 2007; Zhang y col., 2006).

En este capítulo se ha demostrado que los rotíferos pueden transmitir el VNNV a las larvas de lubina, una de las especies con mayor producción en la acuicultura del sur de Europa, que se ve afectada de forma severa por la infección con cepas RGNNV (Bandín y Souto, 2020; Breuil y col., 1991; Le Breton y col., 1997; Vendramin y col, 2014). Los resultados obtenidos sugieren que el uso de rotíferos portadores del VNNV en la alimentación de los estados larvarios podría desencadenar un brote de ERV en una criadero de lubinas, ya que la administración de una sola dosis fue suficiente para causar la enfermedad y provocar la mortalidad de todo un lote de peces, del mismo modo que ocurrió en la infección por baño. Sin embargo, el progreso patológico mostró un avance diferente entre las dos rutas de infección (oral y por inmersión), en contraposición a los resultados de Lampou y col. (2020) que describieron un progreso similar de la enfermedad después de la infección a través de la piel y del esófago. Nuestros resultados indican que la infección por vía oral ocurre de forma más lenta y heterogénea, con una gran variabilidad entre las muestras especialmente en los primeros días. Esta heterogeneidad entre los datos probablemente sea debida a la baja prevalencia de larvas positivas en este periodo de tiempo y al tamaño muestral, señalando la gran importancia del diseño de los muestreos utilizando un número de individuos adecuado, que represente a toda la población, especialmente durante las fases iniciales de la infección.

A pesar de que al inicio de la infección oral se infectó un número bajo de individuos, la replicación viral en los mismos y la liberación de partículas infectivas fue suficiente para desencadenar la infección en los restantes miembros de la población. En este grupo, los primeros signos clínicos se detectaron a partir del día 19 pi, coincidiendo con una gran vacuolización del SNC, mientras que, en los peces infectados mediante baño, se observaron antes, probablemente debido a la exposición uniforme de todas las larvas al

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

virus, y a la entrada del VNNV a través de diferentes vías como los ojos, las branquias y la piel (Lampou y col., 2020). Las vías de transmisión horizontal ensayadas en este estudio demostraron la alta susceptibilidad al VNNV de las larvas de lubina de 12 dpi, que aún no poseen un sistema inmunitario plenamente funcional (Breuil y col., 1997; Scapigliati y col., 2002). Asimismo, los datos obtenidos tras la infección por vía oral indican que los rotíferos mantienen la infectividad y virulencia de las partículas virales, ya que la cinética de replicación del VNNV en las larvas observada a partir de los 15 dpi es comparable a la obtenida en la infección por baño.

Los rotíferos son microorganismos marinos filtradores, capaces de internalizar material en suspensión, incluyendo virus y bacterias, y también las partículas virales adheridas al fitoplancton (Zhang y col., 2006). Así, en este trabajo se detectaron mediante IFA e IHC los antígenos de RGNNV en el interior de los rotíferos, principalmente en la corona y el órgano masticatorio, regiones que presentan una gran inervación (Kotikova y col., 2005), y en el lumen del intestino y la cara interna de la cutícula. El modo de entrada del VNNV en el rotífero se produce a través de la corona y el *mástax*, y desde ahí se dirige al intestino, donde las partículas virales podrían atravesar la membrana peritrófica, difundir en el líquido perivisceral del pseudoceloma y adherirse a la cara interna de la cutícula. La interacción del VNNV con las células del invertebrado todavía se desconoce, aunque se ha descrito que el WSSV puede adherirse a las membranas celulares de los rotíferos (Yan y col., 2007). Además, la presencia de inmunoprecipitados, demostró que el VNNV se mantiene en su interior al menos hasta las 48 hpi. Sin embargo, tras cultivar los invertebrados en agua libre de virus, la carga viral comenzó a disminuir rápidamente, alcanzando la eliminación completa a los 6 dpi. Estos datos corroboran publicaciones anteriores en las que el virus solo se detecta en el individuo hasta las 48 hpi, y destacan el papel de los invertebrados como vectores mecánicos del VNNV (Skliris y Richards, 1998).

En resumen, los resultados de este capítulo indican que los rotíferos son eficaces vectores de transmisión del VNNV, y que, por lo tanto, es importante establecer controles rutinarios en los cultivos de estos invertebrados para evitar la introducción del VNNV en los criaderos.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

CAPÍTULO III. PAPEL DEL ZOOPLANCTON EN LA TRANSMISIÓN DEL VNNV: INFECCIÓN DE LARVAS DE LENGUADO MEDIANTE ARTEMIA

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

CAPÍTULO III. PAPEL DEL ZOOPLANCTON EN LA TRANSMISIÓN DEL VNNV: INFECCIÓN DE LARVAS DE LENGUADO MEDIANTE ARTEMIA

3.1. Introducción

Como se ha indicado en el capítulo anterior, los estrictos requerimientos nutricionales de los peces marinos durante las etapas larvarias no se satisfacen con dietas artificiales, por lo que se utiliza el alimento vivo. El crustáceo *Artemia* sp es uno de los invertebrados más utilizados como alimento en la acuicultura. Su uso comenzó alrededor de los años 30 del siglo pasado (Bengtson y col., 2018; Stappen, 1996), aunque fue en la década posterior cuando alcanzó un importante valor de mercado, con el establecimiento de una nueva industria en torno a su producción (Stappen, 1996). Actualmente, se utiliza como alimento de larvas de peces planos, dorada o lubina, entre los 20 – 40 días post eclosión (Wallace y col., 2015).

Ante condiciones ambientales desfavorables o adversas, los individuos de *Artemia* sp producen formas de resistencia, conocidos como quistes, que se caracterizan por mantener el metabolismo detenido. Su desarrollo comienza de nuevo tras la hidratación en agua de mar, dando lugar a la apertura de la membrana y la salida del embrión (210 – 270 µm), que se desarrolla a lo largo de numerosas metamorfosis (Bengtson y col., 2018). El primer estado de desarrollo (instar I) consiste en una larva nauplio de aproximadamente 400 – 500 µm y 1,6 – 3,3 µg de peso, de coloración marronácea anaranjada (Stappen, 1996). Posee tres pares de apéndices y un ojo nauplio de color rojo en la zona anterior de la cabeza, que es el único órgano sensorial presente en este estado. En posición ventral o también

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

extendido por delante del ojo, se localiza el *protocerebrum*, rodeado por hemolinfa (Criel y Macrae, 2002).

Para su uso como alimento, se puede emplear tanto en el estado de embrión como el Instar I. Las ventajas del primero es que su contenido energético es superior al de los nauplios, pero con un tamaño más pequeño, que permite la alimentación de larvas más jóvenes y la transición desde la alimentación con rotíferos. Sin embargo, los embriones son inmóviles por lo que no son aptos para larvas que se alimentan de partículas en suspensión. Por ello, el estado de desarrollo de *Artemia* sp más utilizado en acuicultura es el instar I (Bengtson y col., 2018).

Este crustáceo es un microorganismo filtrador que puede internalizar partículas en suspensión, incluyendo bacterias y/o virus. En 1988, Skliris y Richards sugirieron su posible función como vector del VNNV y, con posterioridad, se detectó este virus en cultivos de *Artemia* en Chipre, y en individuos salvajes capturados en aguas costeras de Japón (Gomez y col., 2008a, Panzarin y col. 2012).

En base al amplio uso de este crustáceo como alimento vivo de estados larvarios y considerando los resultados descritos en el capítulo anterior, el objetivo de este capítulo es evaluar si la especie *Artemia salina* podría actuar como vector del VNNV y propiciar la infección de larvas de lenguado por vía oral.

3.2. Material y métodos

3.2.1. Cepa viral: propagación y titulación

En este estudio se utilizó la cepa recombinante Sa382.17, descrita en el capítulo I, obtenida a partir de un brote de ERV en larvas de dorada. Se propagó en monocapas de E-11 y se tituló según los apartados 1.2.5 y 1.2.8, respectivamente.

3.2.2. Cultivo de microalgas

Las especies de microalgas utilizadas en este trabajo fueron *Nannochloropsis gaditana* (CCMP 526) e *Isochrysis galbana* (CCAP 927/20), proporcionadas amablemente por la Dra. Ana Otero (Departamento de Microbiología y Parasitología, Universidad de Santiago de Compostela).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

El cultivo de microalgas se realizó en agua de mar natural de salinidad 33 ± 0,2 g/l, previamente filtrada a través de una membrana de *nylon* (tamaño de poro 0,2 µm; Sartorius) y esterilizada en autoclave (121 ºC, 20 min, 1,5 atm). El cultivo se inició en tubos de ensayo (80 ml) de cristal y fondo redondo, con una concentración inicial de 10^6 células/ml, y se enriqueció con una solución de macro y micronutrientes denominada GoldMedium (AQUALGAE). Los cultivos se mantuvieron a 22 ºC con aireación continua y un fotoperiodo de 16:8 de luz y oscuridad, con una intensidad de luz de 5.400 lx. La producción se escaló a botellas de vidrio de 1 l cuando el cultivo de microalgas alcanzó la fase estacionaria.

El crecimiento de los cultivos de microalgas se monitorizó diariamente mediante recuento de células en cámara de Neubauer.

3.2.3. Inoculación del VNNV en cultivos de *Artemia*

Los quistes de *Artemia,* proporcionados por Stolt Sea Farm S.A (Galicia, España), se eclosionaron en agua de mar con fuerte aireación a una densidad de 60 quistes/ml. Tras 24 h, se cosecharon los nauplios eclosionados atrayéndolos a una fuente de luz y mediante aspiración con una pipeta, para separarlos de los quistes vacíos y los no eclosionados. El cultivo se mantuvo en botellas de vidrio de 1 l a 22 °C con aireación continua, en una sala iluminada con el mismo fotoperiodo que las microalgas (16:8). Los nauplios de *Artemia* sometidos a ayuno o alimentados durante 24 h con *I. galbana* o *N. gaditana* (10^6 células/ml), se inocularon por baño también durante 24 h. La inoculación se realizó por triplicado utilizando un título viral de 10^5 $TCID_{50}$/ml. Tras este periodo, los invertebrados se lavaron con agua corriente y se mantuvieron sin alimento. La duración del ensayo (7 días) estuvo condicionada por la supervivencia de la *Artemia* en condiciones de ausencia de alimento.

El muestreo (60 individuos de *Artemia*/ml) se realizó a las 24 h, 72 h y 7 días tras el lavado. Las muestras se sometieron a un ciclo de congelación-descongelación para sacrificar a los individuos y así precipitarlos mediante centrifugación a 500 × g durante 5 min, de forma previa al análisis virológico.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3.2.4. Infección experimental en larvas de lenguado

Para evaluar el papel de la *Artemia* en la transmisión del VNNV, se realizaron infecciones experimentales con un total de 550 larvas de lenguado de 30 dpe. Los peces fueron proporcionados por una piscifactoría local (Stolt Sea Farm, S.L.) y se mantuvieron en tanques opacos (25 l) y con aireación continua en un sistema de agua cerrado. De forma previa a las infecciones experimentales, se descartó la presencia de patógenos bacterianos y virales en las larvas de lenguado, siguiendo el protocolo descrito en el apartado 1.2.7.

Tras un período de aclimatación de los peces durante 1 semana a 16 ºC (temperatura de las instalaciones), la temperatura del agua se incrementó progresivamente a razón de 1 ºC/día, hasta los 22 ºC. En cuanto a la alimentación, se les administró diariamente una dosis de 60 nauplios de artemias por larva. También diariamente, se eliminaron los desechos y los restos de alimento no ingerido, y se realizó la renovación parcial del 10 % de volumen del agua de mar.

Los ensayos de infección oral se realizaron con tres grupos de larvas (N = 80) utilizando como inóculo una dosis/larva de 60 nauplios de *Artemia* portadores del VNNV. La inoculación de los nauplios con el VNNV se realizó como se describió anteriormente, y se cultivaron en agua libre de virus durante 48 h antes de alimentar a las larvas. Con fines comparativos, otros tres grupos de larvas (N=80) se infectaron por baño durante 3 h a una concentración de 10^5 $TCID_{50}$/ml. Además, se establecieron dos tanques con larvas control (N=30), uno para la infección por baño, utilizando medio de cultivo celular, y otro para la infección oral, alimentando a las larvas con nauplios de *Artemia* libres de VNNV. Se tomaron muestras de 7 larvas de cada grupo infectado a las 24 y 72 hpi, y a los 5 y 9 días post infección (dpi). Los tanques se inspeccionaron dos veces al día para conocer la evolución de los síntomas de enfermedad y registrar las bajas. Las larvas muestreadas, así como las supervivientes, se sacrificaron según el proceso descrito anteriormente, y junto con las bajas recogidas durante el ensayo, se almacenaron a -20 ºC para el posterior análisis virológico.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3.2.5. Procesado de las muestras para análisis virológico

Las alícuotas de *Artemia* se procesaron mediante homogenización mecánica, utilizando un homogeneizador Tissue Master 125 (OMNI International), mientras que se retiró asépticamente la porción anterior de la cabeza, principalmente tejido cerebral y ojos, de los peces recogidos durante el experimento. Todas las muestras se procesaron con la solución taponadora Earle's siguiendo el proceso descrito en el apartado 1.2.3.

3.2.5.1. Cuantificación de carga viral mediante RT-qPCR

La extracción de ARN se realizó a partir de 150 µl de muestra utilizando el kit Nucleospin ® RNA (Macherey-Nagel) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, un volumen de 150 µl del homogeneizado de las muestras se incubó durante 1 min con 350 µl de tampón RA1 (suplementado con 1 % de β-mercaptoetanol) y 350 µl de etanol 75 % v/v en agua destilada, mezclando con la pipeta. Tras ese tiempo, la muestra se transfirió a una columna de extracción, se centrifugó durante 30 s a 11000 × g y se descartó el tubo colector y el volumen eluido. A continuación, la columna se introdujo en un nuevo vial colector y se realizaron 3 lavados consecutivos con los tampones RAW2 (200 µl) y RA3 (600 µl y 250 µl) sucesivamente, centrifugando entre cada lavado como se describió anteriormente, excepto en el último que se dejó durante 2 minutos. Finalmente, la columna se transfirió a un vial eppendorf, y se eluyó el ARN en 70 µl de agua libre de RNAsas centrifugando durante 1 minuto a 11000 × g. Las muestras se conservaron a -20 ºC hasta su uso.

La síntesis de ADNc y la cuantificación mediante qPCR se realizó de acuerdo con el proceso descrito en el apartado 1.2.4.

3.2.6. Ensayo de fluorescencia indirecta (IFA) en nauplios de *Artemia*

Un cultivo de *Artemia* inoculado como en el apartado 3.2.3, se mantuvo durante 72 h sin aporte de alimento (microalgas). Tras ese tiempo, los individuos se recogieron para visualizar la localización de las partículas del VNNV mediante IFA, siguiendo el protocolo descrito en el apartado 2.2.6, a excepción del anticuerpo primario utilizado. En este caso, se utilizó el

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

anticuerpo anti-VNNV ab26812 (abcam) diluido en PBS a una proporción 1:10. Se observó la fluorescencia utilizando un microscopio invertido Eclipse T-2000 U (Nikon).

3.2.7. Ensayo de la actividad antiviral de *Isochrysis galbana*

El crecimiento del cultivo de *I. galbana* se monitorizó mediante recuento celular en cámara de Neubauer y, tras alcanzar la fase estacionaria, se centrifugó a 400 × g durante 20 min para precipitar las microalgas y bacterias presentes en el cultivo. El sobrenadante de la centrifugación se utilizó para evaluar su posible actividad frente al virus, mediante incubación por triplicado a 25 ºC con la cepa Sa382.17 a título 10^6 $TCID_{50}$. Tras un periodo de aclimatación de 1 h, se recogió una alícuota (1 ml) y, posteriormente, a las 24 h, 72 h y 7 días de incubación. Cada una de las alícuotas se incubó 1:1 v/v con la solución tamponadora Earle's, siguiendo el proceso descrito en el apartado 1.2.3. La carga viral expresada como $TCID_{50}$ y número de copias se calculó según el protocolo descrito en los apartados 1.2.8 y 1.2.4.3, respectivamente.

3.2.8. Análisis estadístico

Las curvas de mortalidad se analizaron mediante tablas de supervivencia y el test Kaplan Meyer, y se usó la prueba Log-Rank (Mantel-Cox) y Chi-cuadrado para determinar las diferencias significativas entre grupos. Los datos de carga viral se analizaron siguiendo los estadísticos descritos en el apartado 1.2.9.

3.3. Resultados

3.3.1. Acumulación del VNNV en los nauplios de *Artemia*

Los cultivos de *Artemia* inoculados con la cepa Sa382.17 no mostraron ningún tipo de alteración morfológica o de comportamiento natatorio anormal durante el transcurso de los ensayos.

3.3.1.1. Detección mediante IFA

La fluorescencia específica se localizó principalmente en la región de la cabeza de los nauplios de *Artemia*. Si bien este estado larvario ya presenta el ojo nauplio (NE) totalmente diferenciado (**Fig**. **III.1A**) (Wildt y Harzsch, 2002), la fluorescencia no se observó en esa región, indicando que el VNNV

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

no muestra tropismo hacia este órgano (**Fig. III.1B**). Sin embargo, la señal fluorescente se concentró en la región posterior al NE (**Fig. III.1C**), donde se localizan las células preliminares formadoras de los pedúnculos oculares (CE). En los individuos adultos, éstos están formados por el ojo compuesto y dos neurópilos ópticos, la lámina *ganglionaris* y la médula externa, y contienen las neuronas formadoras del nervio óptico que se dirigirán al lóbulo protocerebral (Criel y Macrae, 2002; Wildt y Harzsch, 2002). Además, aunque en menor medida, también se detectó fluorescencia a lo largo de todo el cuerpo del invertebrado.

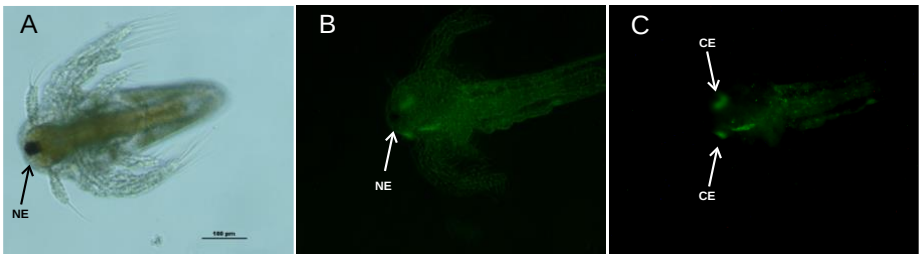


Figura III.1. Tinción inmunofluorescente de nauplios de *Artemia* inoculados con la cepa Sa382.17 de VNNV durante 24 h y cultivados en agua de mar estéril durante 48 h; luz natural **(A),** FITC y luz natural **(B)** y fluorescencia FITC **(C).** La escala representa 100 µm. NE: ojo nauplio; CE: células preliminares formadoras del ojo complejo.

3.3.1.2. Carga viral en los cultivos de *Artemia* no enriquecidos con microalgas

El genoma del VNNV se detectó en los individuos de *Artemia* hasta el final del experimento (8 dpi). A las 24 hpi, el número medio de copias de ARN/ml era de $2{,}88 \times 10^5$, y no se observaron diferencias significativas con respecto al inóculo (p valor > 0,05). Sin embargo, a las 48 hpi, se observó un aumento no significativo hasta $7{,}46 \times 10^5$ (p valor > 0,05) (**Fig. III.2**), y aunque a los 4 dpi se produjo una reducción significativa de la cantidad de ARN viral ($1\ 6{,}78 \times 10^4$; p valor < 0,05), ésta se mantuvo estable hasta el día 8 pi, por lo que la carga de VNNV en los invertebrados al final del experimento estaba en valores intermedios ($1{,}97 \times 10^4$).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

El virus se recuperó en cultivo celular en las muestras de *Artemia* tomadas hasta los 4 dpi, respectivamente.

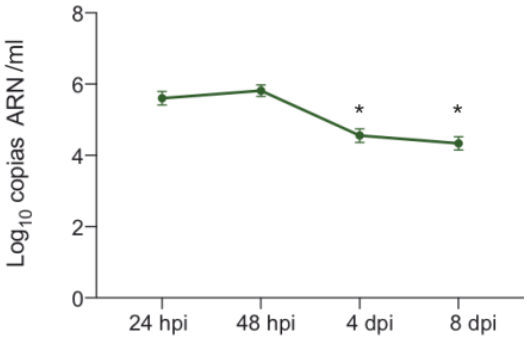


Figura III.2. Carga viral cuantificada en los nauplios de *Artemia* inoculados con la cepa Sa382.17 mediante baño, y sin el enriquecimiento con microalgas. Los datos representan el promedio y desviación estándar de las 3 réplicas. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto a la carga a las 24 hpi (p valor < 0,05).

3.3.1.3. Carga viral en los cultivos de *Artemia* enriquecidos con microalgas

En cuanto a la *Artemia* enriquecida con microalgas (**Fig. III.3**), se observó una disminución significativa en el número de copias de ARN viral con el progreso de la infección. A las 24 hpi, la carga viral en los nauplios era de $2{,}84 \times 10^5$ copias/ml. El grupo sin alimentar mantuvo este valor a las 48 hpi, mientras que en los grupos alimentados con microalgas se redujo hasta un valor aproximado de $3{,}4 \times 10^4$. A partir de las 48 hpi, la carga viral en el grupo no alimentado comenzó a descender hasta alcanzar las 10^4 copias/ml en el día 8 pi. Sin embargo, los grupos alimentados mantuvieron la misma carga viral a los 4 dpi, y se observó una reducción en el día 8 pi, con valores de en torno a $3{,}4 \times 10^3$ copias/ml. Estos resultados indican una reducción significativa de la carga viral en los grupos alimentados con respecto a los no alimentados a las 24 hpi (p valor 0,0001).

Aunque se detectó genoma viral hasta el día 8 pi, la recuperación de partículas virales infectivas en cultivo celular únicamente se logró en las

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

muestras recogidas hasta las 48 hpi (tanto de individuos alimentados como no alimentados).

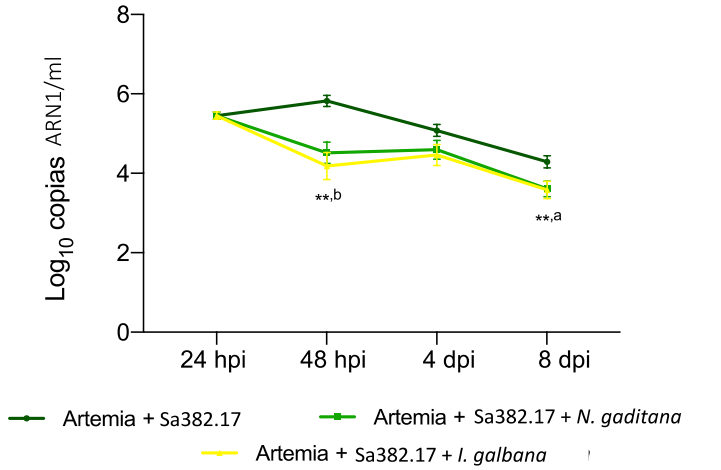


Figura III.3. Carga viral cuantificada en los nauplios de *Artemia* inoculados por baño durante 24h sin alimentación (verde oscuro) y alimentados con *N. gaditana* (verde claro) y con *I. galbana* (amarillo). Los datos representan el promedio y desviación estándar de las 3 réplicas. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto a la carga a las 24 hpi (p valor < 0,05) y las letras muestran diferencias significativas en cada punto con respecto al grupo no alimentado.

3.3.2. Infección de las larvas de lenguado

Los análisis virológicos y bacterianos realizados antes de comenzar las infecciones experimentales dieron un resultado negativo. Además, durante el desarrollo de los experimentos posteriores, no se observaron signos de ERV en las larvas utilizadas como control, ni se produjeron bajas.

La mortalidad en las larvas de lenguado comenzó en el día 7 pi, tanto en las infectadas por vía oral como por baño, con valores del 4 % en el grupo alimentado con *Artemia* portadoras de VNNV y del 12 % en la infección por baño. Estos valores ascendieron en el día 9 pi hasta el 27 % y 45 % en la infección oral y por baño, respectivamente. El pico de mortalidad se observó a los 11 días pi (dpi), y alcanzó un valor del 66 % en las larvas alimentadas con individuos de *Artemia* portadores de VNNV y un 100 % en las infectadas por baño (**Fig. III.4**). El ensayo de infección oral se finalizó a los 12 días post

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

infección, a pesar de que no se alcanzó el 100 % de mortalidad, ya que las larvas de lenguado dejaron de ingerir *Artemia* y la transición a dieta artificial no se pudo realizar con éxito.

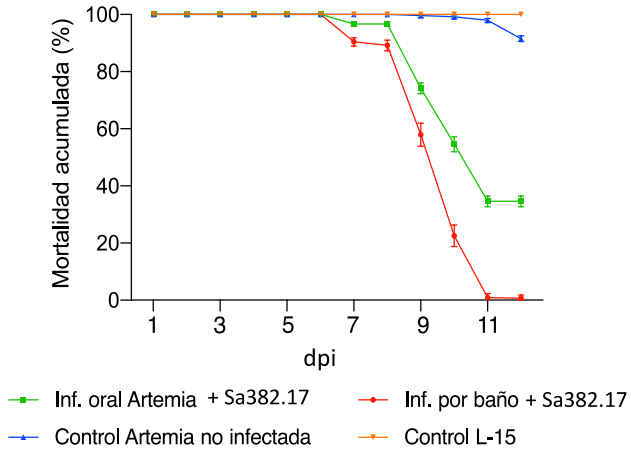


Figura III.4. Mortalidad acumulada en las larvas de lenguado tras la infección oral con Artemia (verde) y por baño (rojo), y en los controles negativos de alimentación (azul) y baño (naranja). Los datos representan el promedio y desviación estándar de las 3 réplicas.

En cuanto a la sintomatología, se observó por primera vez un patrón de natación anormal en las larvas infectadas mediante baño a los 9 dpi, mientras que en la infección oral ocurrió un día más tarde. Tal y como ya se comentó previamente, no se observaron signos de enfermedad ni muertes en el control negativo de infección. Aunque se detectó una baja mortalidad acumulada (9%) en los peces alimentados con *Artemia* no inoculada, todos los individuos fueron asintomáticos y en ninguno se detectó VNNV mediante cultivo celular o qPCR, por lo que se desconoce la causa de la muerte. Las curvas de mortalidad en las larvas infectadas tanto de forma oral como por baño fueron significativamente superiores a las del grupo control según el test Log-Rank (Mantel-Cox) y Chi cuadrado (p valor < 0,05 en ambos casos), por lo que se pueden atribuir esos valores de mortalidad al VNNV, independientemente de la vía de infección.

En cuanto a la carga viral en los individuos muestreados durante el experimento (**Fig. III.5**), aquellos infectados por vía oral contenían $9{,}34 \times 10^4$

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

copias de ARN viral/larva a las 24 hpi, mientras que la infección por baño resultó en $2{,}05 \times 10^6$ copias de ARN/larva, lo que representa una diferencia de 1,34 logaritmos. Sin embargo, aunque la mortalidad acumulada aumentó con el tiempo, el número de copias de ARN del VNNV detectado en las larvas muestreadas no mostró variaciones significativas y se mantuvo constante a lo largo del experimento ($8{,}97 \times 10^4$ y $9{,}33 \times 10^6$ a los 9 dpi para la infección oral y por baño, respectivamente), por lo que la diferencia de carga viral entre ambas vías de infección también se mantuvo invariable.

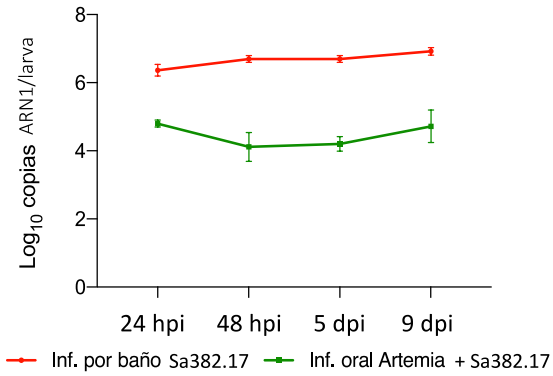


Figura III.5. Carga viral detectada en las larvas muestreadas, tanto para la infección mediante vía oral como por baño. Los datos representan el promedio y desviación estándar de las 3 réplicas.

Por otra parte, la carga viral cuantificada en las larvas muertas a los 7 dpi fue $3{,}19 \times 10^5$ para la infección oral y $1{,}67 \times 10^7$ para la infección por baño, y aumentó a $4{,}82 \times 10^5$ y $4{,}90 \times 10^7$ en el día 11 pi, manteniendo la diferencia en aproximadamente 2 logaritmos. Estos datos de carga viral fueron similares a los observados en los peces muestreados. El número de copias de ARN en los supervivientes de la infección oral no mostró diferencias con el obtenido en las larvas muestreadas a los 9 dpi.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3.3.3. Ensayo de la actividad antiviral de *Isochrysis galbana*

Debido a que, como se describió en el apartado 3.3.1.3, la alimentación de los cultivos de *Artemia* con microalgas contribuyó a la reducción de la carga viral, se decidió investigar el efecto del medio de cultivo de las microalgas, compuesto principalmente por agua de mar, restos de los macro- y micronutrientes y las sustancias secretadas por las microalgas, sobre la viabilidad del virus. Para ello, se incubó la cepa Sa382.17 en el medio de cultivo de *N. gaditana* e *I. galbana* y se comparó la supervivencia viral con la del agua de mar.

Como se esperaba, la incubación del VNNV en agua de mar durante 7 días no provocó una reducción del título viral. Sin embargo, la carga viral se redujo claramente cuando se incubó durante 72 horas en el medio de cultivo de *N. gaditana* (casi 2 log, p valor 0,0009) y aún más en el caso de *I. galbana* (más de 3,5 log; p valor 0,0001) (**Fig. III.6**).

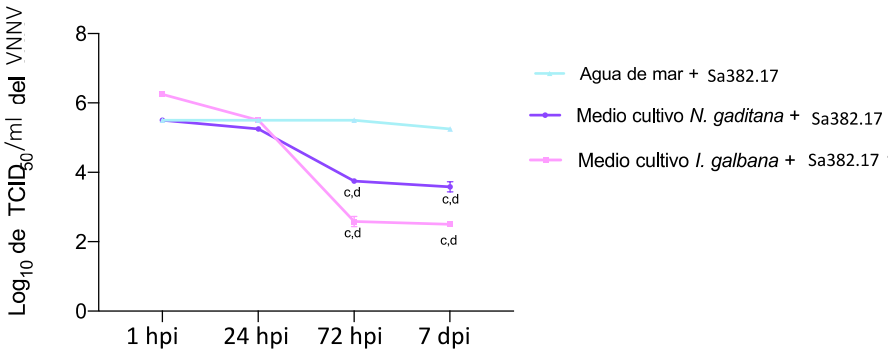


Figura III.6. Carga viral expresada como $TCID_{50}$/ml tras la incubación del VNNV el medio de cultivo de las microalgas (violeta: *N. gaditana*; rosa: *I. galbana*) y en agua de mar (azul claro). Los datos representan el promedio y desviación estándar de las tres réplicas. Las letras indican diferencias significativas en ese punto con respecto a la carga viral de las 24h (c, p valor < 0,001) y con el agua de mar (d, p valor < 0,001).

De forma similar, el número de copias de ARN también mostró una reducción de 2,27 log (p valor 0,0002) tras 7 días de incubación en el medio de cultivo de *I. galbana* (**Fig. IV.7**), mientras que la reducción no fue

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

significativa en la incubación con agua de mar ni con el medio de cultivo de *N. gaditana* (0,59 log; p valor 0,1239).

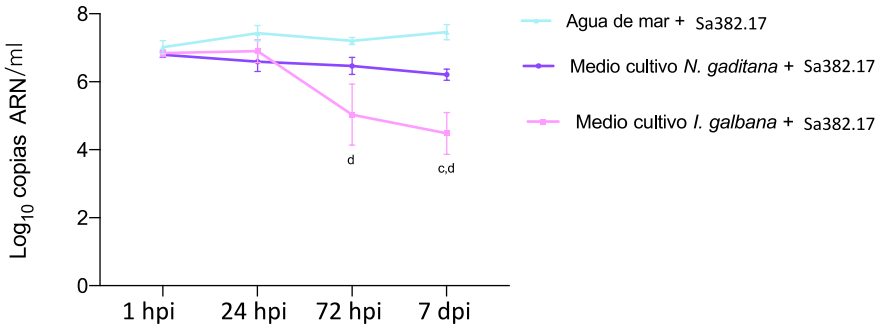


Figura III.7. Carga viral expresada como copias de ARN/ml tras la incubación del VNNV el medio de cultivo de las microalgas (violeta: *N. gaditana*; rosa: *I. galbana*) y en agua de mar (azul claro). Los datos representan el promedio y desviación estándar de las tres réplicas. Las letras indican diferencias significativas en ese punto con respecto a la carga viral de las 24h (c, p valor < 0,001) y con el agua de mar (d, p valor < 0,001).

3.4. Discusión

El posible papel de la *Artemia* como vector viral fue sugerido por Cano y col. (2001) al demostrar que las partículas del virus de la linfocistis (LCDV) se podían bioacumular en el interior del crustáceo. Posteriormente, otros autores demostraron su implicación en la transmisión del LCDV a alevines de dorada y larvas de lenguado senegalés (Carballo y col., 2019; Valverde y col., 2019). Algunos trabajos han evidenciado el papel de diferentes especies de *Artemia* como vectores de virus de crustáceos, tal es el caso del Virus de la Mionecrosis Infecciosa Viral (*Infectious Mionecrosis Virus*; IMNV) (Liu y col., 2018), el Nodavirus de la Mortalidad Encubierta (*Covert Mortality Nodavirus*; CMNV), el baculovirus penaei (da Silva y col., 2015; Overstreet y col., 1988), el nodavirus *Macrobachium rosembergii* (MrNV) (Sudhakaran y col., 2006), o el parvovirus hepatopancreático (*Hepatopancreatic Parvo-like Virus*; HPV) (Sivakumar y col., 2009). En base a todos estos estudios decidimos evaluar la posible transmisión del VNNV a larvas de lenguado senegalés mediante la vía oral utilizando cultivos de *Artemia* como vector.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

La alimentación de las larvas de lenguado (30 dpe) con una dosis de nauplios de *Artemia* portadores de VNNV provocó una mortalidad del 66 % tras 11 días. Esta elevada mortalidad, junto con la recuperación de partículas virales infectivas a partir de muestras de tejido cerebral de las larvas, demostró el papel del crustáceo como vector de partículas infectivas del VNNV. Tanto los valores de mortalidad como la carga viral en los lenguados fueron menores que en la infección por baño utilizada como control positivo, probablemente debido a las diferentes vías de entrada del virus en el huésped. Como se describió en la introducción, el VNNV presente en el agua durante la infección por baño utiliza las branquias, la piel y la cavidad oral como portales de entrada al huésped (Souto y col., 2018a). Sin embargo, mediante la ruta oral, la única vía de entrada al organismo es a través del tracto digestivo. Por tanto, la infección por VNNV en las larvas de lenguado se desencadenó, probablemente, tras el proceso de digestión del crustáceo en el interior del pez, seguido de la diseminación hacia el tejido cerebral, bien a través del sistema nervioso o de la vía hematógena (Bandín y Souto, 2020).

Los resultados obtenidos en este capítulo coinciden con los obtenidos por Carballo y col. (2019), que muestran diferencias en la carga de LCDV en larvas de lenguado en función de la ruta de infección utilizada. Sin embargo, en base a los datos de la infección de larvas de lubina mediante rotíferos portadores de VNNV mostrados en el capítulo I, se podría asumir que, de haber podido continuar el experimento, la liberación de partículas virales por parte de las larvas infectadas por vía oral habría conducido a la infección del resto de los individuos y a alcanzar una mortalidad similar a la del ensayo de inmersión.

En cuanto al desarrollo de la patología, las larvas de lenguado evidenciaron sintomatología característica de la infección por ERV en ambas rutas de infección, mostrando un comportamiento anormal, basado en natación en bucles y reposo boca arriba. Estos resultados indican que los receptores celulares con los que interactúa el VNNV en el cerebro y en la retina en los lenguados adultos ya se encuentran diferenciados en las larvas de lenguado de 30 dpe, tal y como se ha descrito en el capítulo anterior en lubina y en otras especies de peces, como el mero, el jurel o el fletán (Breuil y col., 2002; Gromol y col., 1999; Mori y col., 1991; Nguyen y col., 1996). Sin

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

embargo, en el caso del LCDV, la alimentación con metanauplios de *Artemia* portadores del virus no provocó las típicas alteraciones en piel y branquias, que únicamente fueron evidentes tras la infección por baño ya que permite una mayor exposición del órgano diana al patógeno (Carballo y col., 2019).

Al igual que los rotíferos, la *Artemia* posee una alimentación filtradora, que permite la internalización de partículas de tamaño inferior a 50 μm (Kiørboe, 2011) que, una vez ingeridas, podrían atravesar la membrana peritrófica (en el caso de los nauplios de *Artemia* permite el paso de partículas de diámetro inferior a 70 nm) y dispersarse mediante la hemolinfa a lo largo del cuerpo, gracias al sistema circular lacunar (Criel y Macrae, 2002). Así, los virus presentes en el medio acuático podrían bioacumularse en este crustáceo, explicando su papel como vectores mecánicos del VNNV. La detección de antígenos virales principalmente en las células preliminares del ojo, aunque también en toda la región anterior, podría indicar que el VNNV mantiene el tropismo hacia las células nerviosas de la *Artemia*. En sus estudios con el LCDV, Cano y col. (2001) observaron señal de hibridación inmunohistoquímica a lo largo de todo el cuerpo de la *Artemia* infectada con el virus LCDV, y especialmente en la zona del tracto digestivo, lo que apoya la hipótesis de que la internalización de las partículas virales se produce mediante filtración.

La carga viral en *Artemia* disminuyó a lo largo del curso experimental, indicando la ausencia de replicación viral. A pesar de este descenso, se recuperaron partículas infectivas en cultivo celular en las muestras obtenidas hasta el día 4 pi, sugiriendo que el VNNV se mantiene en el interior del crustáceo durante las distintas metamorfosis, tal y como se ha indicado en el caso de *Artemia* infectada con el XSV (Sudhakaran y col., 2006, 2007). Además, no se logró la eliminación del virus del interior del crustáceo, al menos en el período durante el que se desarrollaron estos experimentos (8 días), lo que resalta el papel de estos crustáceos como vectores mecánicos del VNNV, en comparación con el de los rotíferos, en los que se produce la eliminación viral en un período inferior a 6 días.

Si bien las imágenes de fluorescencia indican que la internalización del VNNV ocurre mediante el tracto digestivo, el mecanismo de dispersión del

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

virus en el interior de la *Artemia* todavía no se conoce. Un estudio realizado en el langostino de Malasia reveló que la proteína transglutaminasa MrTGII, localizada en la superficie de los hemocitos, permite y facilita la entrada del MrNV en estas células (Sirikharin y col., 2019). Se puede especular, que a pesar de las grandes diferencias entre este crustáceo y la *Artemia*, el VNNV podría ser incorporado en los hemocitos mediante esta proteína o alguna homóloga, y posteriormente diseminarse mediante la hemolinfa a lo largo de todo el cuerpo.

Debido a que durante el período experimental, se observó cierta mortalidad en los cultivos de *Artemia* a partir de los 4 dpi, se decidió evaluar si las bajas observadas se debían a la acumulación viral en el cuerpo del crustáceo, o a los efectos de la inanición sobre sus funciones corporales, ya que, durante las infecciones experimentales, no se enriquecieron con microalgas con el fin de mantener el tracto digestivo vacío.

En estos nuevos ensayos, los cultivos de *Artemia* se alimentaron, tras la infección viral, con las dos especies de microalgas más comúnmente utilizadas en acuicultura, *N. gaditana* e *I. galbana* (Hemaiswarya y col., 2011). Las microalgas se utilizan como enriquecimiento del zooplancton, proporcionándoles ácido docosahexaenoico -DHA-, ácido eicosapentaenoico -EPA- y aminoácidos libres -FAA- entre otros (Eryalçın, 2018, 2019; Ferreira y col., 2018). Si bien no se observó una diferencia significativa en la mortalidad entre ambos experimentos, es destacable que la carga viral en los invertebrados enriquecidos con microalgas fue menor que la de los no alimentados, independientemente de la especie de microalga utilizada. Esta reducción sugiere que el uso de microalgas para enriquecer el zooplancton podría tener consecuencias positivas para el cultivo de fases larvarias de peces, ya que se observa una reducción de viabilidad del VNNV, y que también podría resultar eficaz frente otros virus. En este sentido, se ha visto que algunas micro y macroalgas producen y liberan compuestos con fuerte actividad antibacteriana y antiviral, como las lectinas, polisacáridos, algunos pigmentos, péptidos, polifenoles o flavonoides, que actúan en las distintas fases del ciclo viral (Carbone y col., 2021; Falaise y col., 2016; Milena y col., 2021), por lo que también se evaluó si las especies utilizadas en este estudio poseían esa capacidad. Para ello, se incubó el VNNV durante 7 días en el

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

sobrenadante obtenido tras centrifugar los cultivos de *N. gaditana* e *I. galbana* en la fase estacionaria, compuesto principalmente por agua de mar, restos de los macro- y micronutrientes con los que se enriqueció el cultivo, y sustancias producidas por las microalgas, y se comparó la supervivencia viral con la del agua de mar. La viabilidad del VNNV no se vio alterada tras la incubación en agua de mar, tal y como ya se describió con anterioridad (Frerichs y col., 2000). Sin embargo, la incubación del VNNV con ambos sobrenadantes de los cultivos se tradujo en una reducción significativa de los valores de viabilidad, de 2 logs en el caso de *N. gaditana* y 3,5 logs en el caso de *I. galbana*, mientras que los valores de copias genómicas sólo disminuyeron tras la incubación con *I. galbana*. Estos resultados indican que ambas microalgas podrían producir algunas sustancias con propiedades inhibitorias del VNNV. Aunque es necesario estudiar el mecanismo de acción, es conocido que los metabolitos de las microalgas pueden afectar al proceso de adsorción y penetración viral, bien afectando directamente al virus, bloqueando los receptores celulares (Hernández-Corona y col., 2002), o alterando la replicación viral o el ensamblado de los viriones (Huheihel y col., 2002).

La principal conclusión de este trabajo es que el crustáceo *Artemia salina* actúa como vector del VNNV hacia larvas de lenguado, que sufren la ERV de manera similar a la infección por baño. Además, las microalgas utilizadas frecuentemente como enriquecimiento del zooplancton poseen ciertas propiedades antivirales frente al VNNV.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

CAPÍTULO IV. EFECTO DE LA DENSIDAD DE CULTIVO EN LA INFECCIÓN POR EL VNNV EN LENGUADO

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

CAPÍTULO IV. EFECTO DE LA DENSIDAD DE CULTIVO EN LA INFECCIÓN POR EL VNNV EN LENGUADO

4.1. Introducción

La gran demanda de pescado y sus derivados a nivel mundial ha llevado al desarrollo de nuevas estrategias de cultivo enfocadas hacia la producción intensiva, incluyendo la cría de peces en densidades elevadas o el cultivo de diferentes especies en cohabitación, aspecto que se abordará en el capítulo siguiente. Sin embargo, esta intensificación está relacionada con eventos adversos para el cultivo como la aparición de episodios patológicos (Naylor y col., 2021), debido a que se incrementa la tasa de contacto entre individuos sanos susceptibles e infectados, facilitando la trasmisión de las infecciones y dificultando la erradicación de los patógenos (Krkošek, 2010).

La intensificación de las condiciones de cultivo también afecta al bienestar de los peces, ya que puede desembocar en una situación de estrés por hacinamiento. Además, se produce un empeoramiento de la calidad del agua debido al incremento en la concentración de compuestos derivados del nitrógeno, como el nitrito o el amonio, producidos principalmente a partir de los deshechos de los peces. Estos compuestos pueden bioacumularse en branquias, corazón o hígado, afectando a la homeostasis general del pez e induciendo una situación de estrés químico (Ciji y Akhtar, 2020; Kim y col., 2020).

Los episodios de estrés desencadenan una respuesta fisiológica cuantificada por los niveles de catecolaminas circulantes y de las hormonas relacionadas con el estrés, como el cortisol, producidas como resultado de la activación del eje hipotálamo – hipófisis – células interrenales (HPI) tras la exposición al agente estresante. El cortisol es una hormona que se libera desde

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

las células interrenales y actúa en diferentes tejidos, uniéndose a factores transcripcionales de receptores glucocorticoides o mineralocorticoides, que modulan la expresión de numerosos genes (Du y col., 2019; Samaras y col., 2018; Sopinka y col., 2016; Tort, 2011). Entre ellos se encuentra el gen *hsp* (del inglés, *heat shock protein*), que interacciona con el factor transcripcional HSF (*heat shock factor*) dando lugar a la síntesis de las proteínas HSP (Pockley, 2003; Sopinka y col., 2016), el gen *gr*1 (del inglés, *glucocorticoid receptor*) que codifica los receptores de glucocorticoides, incluyendo los receptores de cortisol entre otros, o el gen de la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (*pepck*), cuya expresión se potencia tras la activación de la producción de glucosa mediada por el cortisol (Kim y col., 2013). Por tanto, el nivel de expresión de estos genes se puede utilizar como un bioindicador de los niveles de estrés (Kim y col. 2013). Por otra parte, la exposición de los peces a un agente estresante también supone una reducción de la resistencia a enfermedades y de la supervivencia (Lemos y col., 2018; Sopinka y col., 2016; Tort, 2011).

Así, considerando que la transmisión horizontal del VNNV se podría ver favorecida por el incremento en el número de individuos susceptibles, el objetivo de este capítulo es determinar el efecto de la densidad de cultivo sobre la aparición de brotes de ERV en las instalaciones acuícolas.

4.2. Material y métodos

4.2.1. Ensayos de infección en peces

En este experimento se utilizaron un total de 885 juveniles de lenguado (peso corporal medio 1 ± 0,1 g), que se aclimataron a 22 °C en tanques opacos de 300 l con agua de mar (salinidad 33 g/l). Antes de los ensayos, se realizó un análisis virológico y bacteriológico de una muestra de 5 peces recogidos al azar, siguiendo el proceso descrito en el apartado 1.2.7.

Los peces se infectaron mediante inmersión con la cepa Ss160.03 (descrita en el capítulo I) a una concentración de 10^5 $TCID_{50}$/ml durante 4 h con fuerte aireación. A continuación, se distribuyeron aleatoriamente en 12 tanques de fondo plano (superficie: 700 cm^2) para ensayar, por triplicado, diferentes densidades de cultivo diseñadas en función de la superficie del tanque y el volumen de agua (**Fig. IV.1**):

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

a) Densidad baja (LD "*low density*": 20 peces; 0,028 g/cm^2 o 1 g/l).

b) Densidad media – baja (MLD "me*dium-low density*": 50 peces; 0,071 g/cm^2 o 1 g/l).

c) Densidad media (MD "*medium density*": 50 peces; 0,071 g/cm^2 o 5 g/l).

d) Densidad alta (HD "*high density*": 100 peces; 0,142 g/cm^2 o 10 g/l).

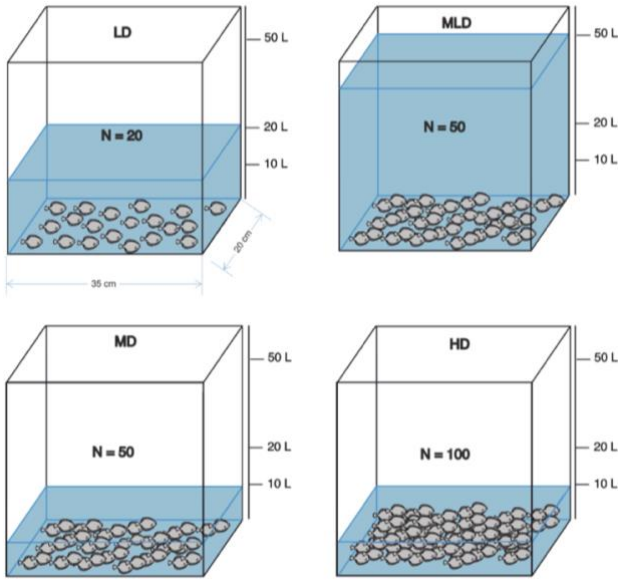


Figura IV.1. Representación esquemática de las cuatro densidades de cultivo de las infecciones experimentales: densidad baja (LD: 0,028 g/cm^2 o 1 g/l), densidad media-baja (MLD: 0,071 g/cm^2 o 1 g/l), densidad media (MD: 0,071 g/cm^2 o 5 g/l), y densidad alta (LD: 0,142 g/cm^2 o 10 g/l).

De los tres tanques réplica, uno de ellos se utilizó para el muestreo de peces (N = 3) en los días 3, 5, 7, 10, 15, 20, 25, 30 y 35 pi. En los dos tanques restantes se supervisó el progreso de la infección en los peces, registrando tanto los signos de enfermedad como la mortalidad diaria. También se cuantificó la carga viral en el agua, recogiendo una alícuota de 50 ml tras 1 hpi y en los días 1, 2, 3, 5, 7, 10, 15, 20, 25, 30 y 35 pi. Tras la toma de muestras, no se añadió agua de mar adicional en los tanques experimentales. Las muestras de peces y de agua se conservaron a -20°C hasta su uso.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

También se estableció un tanque de control de infección por cada densidad que se trató de la misma forma que los peces infectados, utilizando medio de cultivo L-15 para la inmersión.

4.2.2. Análisis virológico

Las muestras de agua se centrifugaron dos veces a 96.000 × g durante 1 h en un rotor SW32ti (Beckman Coulter), y el virus precipitado se resuspendió en 500 µl de tampón de citrato de sodio (SSC) 1X.

Los peces recogidos durante el experimento se procesaron retirando asépticamente la porción anterior de la cabeza. Las muestras se homogeneizaron individualmente (peces muertos) o en lotes de 3 (supervivientes) siguiendo el proceso descrito en el apartado 1.2.3, y la cuantificación de carga viral se realizó según el apartado 1.2.4.

4.2.3. Expresión de genes relacionados con estrés

El ADNc se amplificó mediante RT-qPCR utilizando 200 nM de cada pareja de cebadores de los genes *hsp*70, *gr*1 y *pepck* recogidos en la **Tabla IV.1,** y el protocolo detallado en el apartado 1.2.4.3, excepto el paso de unión-extensión (ver **Tabla IV.1**). Los datos de expresión génica se normalizaron utilizando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak y Scmittgen, 2001), tomando como referencia el gen endógeno ribosomal 18S y los peces control bañados con medio de cultivo.

Tabla IV.1. Secuencia de las parejas de cebadores utilizados para la cuantificación de los genes relacionados por el estrés (*hsp*70, *gr*1, *pepck* y 18S), y la temperatura utilizada en el paso unión-extensión de la qPCR.

Gen	Secuencia cebadores (5'-3')	Unión-Extensión
*hsp*70[a]	F: GCTATACCAGGGAGGGATGGAAGGAGGG R: CGACCTCCTCAATATTTGGGCCAGCA	70 ºC; 30 s
*gr*1[b]	F: ACTGGTTCCCACAATGCTGT R: ATCGGTTCAGGGTCGTCAT	60 ºC; 45 s
pepck[c]	F: ACCGTTCTTCGGCTACAACT R: GCTGCTCGGGTCCTTTCT	60 ºC; 45 s
18S[d]	F: GTCTGGTTAATTCCGATAA R: ACCTGTTATTGCTCAATC	60 ºC; 15 s

a. Salas-Leiton y col., 2010; b. Alves Martins y col., 2013; c. Kim y col., 2013; d. López-Vázquez y col., 2016.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4.2.4. Concentración de compuestos derivados del nitrógeno

El agua de los tanques de cultivo de peces no se renovó durante las infecciones experimentales. Debido a eso, se determinó la concentración de nitritos (NO^{-}_{2}) y amonio total ($NH_3 + NH^{+4}$) en los tanques asignados para la toma de muestras de agua, y en los mismos puntos en los que se realizó el muestreo. Las concentraciones de cada compuesto se estimaron utilizando los test comerciales de amonio y nitrito API® (MARS Fishcare).

4.2.5. Análisis estadístico

Los datos de carga viral se analizaron estadísticamente según la metodología descrita en el apartado 1.2.9.

4.3. Resultados

4.3.1. Mortalidad acumulada y sintomatología

El inicio de la mortalidad se produjo en el día 1 pi en los tanques de densidad alta (HD) y media (MD), con 12 y 10 bajas, respectivamente (**Fig. IV.2**). En ambos grupos, la mortalidad alcanzó rápidamente valores del 50 % en el día 17 pi y, a continuación, se observó una ralentización en las bajas, por lo que se decidió finalizar el experimento en el día 35 pi. En este momento, la mortalidad en el grupo HD era del 73 % y en el MD del 67 %. El inicio de mortalidad mostró cierto retraso en los grupos de densidad baja (LD; día 26 pi) y media-baja (MLD; día 12 pi). Como se muestra en la **fig. IV.2**, el número de bajas se incrementó lentamente con el paso de los días, aunque al final del experimento se alcanzó un 27 % y un 46 % en los grupos LD y MLD, respectivamente. Los valores de supervivencia, evaluados con el test Kaplan-Meier, y las diferencias entre los 4 grupos, calculados mediante el test Log-Rank y el Chi-cuadrado, indicaron que la mortalidad en los grupos de densidad alta y media fue significativamente superior a la registrada en los grupos de densidad baja y media-baja (p valor < 0,05).

En cuanto a la sintomatología, se detectaron signos de ERV, como natación en bucle y reposo boca arriba, anorexia y letargo, en todos los grupos infectados, desde el día 10 pi en adelante, con la excepción del grupo de densidad baja en el que el comienzo de los signos se retrasó 3 días, hasta el día 13 pi. En los grupos control, bañados con medio de cultivo L-15, no se

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

observaron signos de enfermedad ni se detectó presencia del VNNV, aunque sí se registraron 2 bajas en el grupo de mayor densidad (HD), posiblemente debidas al manejo.

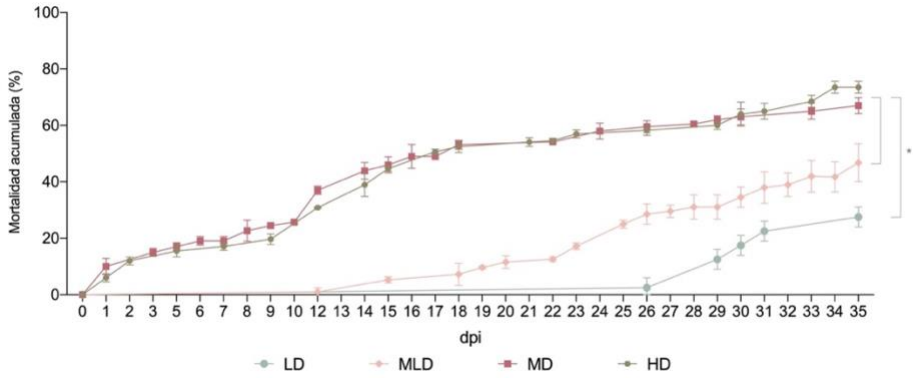


Figura IV.2. Mortalidad acumulada (%) en lenguado cultivado en densidad baja, media-baja, media y alta (LD, MLD, MD y HD, respectivamente) durante 35 días. Los datos representan el promedio y desviación estándar de los 2 tanques réplica. Los asteriscos indican diferencias significativas en la mortalidad acumulada en los tanques de densidad más alta (MD y HD) con respecto a los de media (MD) y baja (LD) densidad (p valor < 0,05).

4.3.2. Cuantificación de carga viral en los peces muertos y los supervivientes al final del ensayo (copias ARN1/g y $TCID_{50}$/g)

Las primeras bajas pertenecientes a los grupos de densidad baja (LD: 26 dpi) y media-baja y (MLD: 12 dpi), contenían una carga viral similar, aproximadamente 10^7 copias de ARN/g y 10^4 $TCID_{50}$/g (**Fig. IV.3**).

En el tanque de baja densidad, la carga viral aumentó de forma progresiva durante el experimento, hasta alcanzar las $1{,}59 \times 10^{10}$ copias / $2{,}1 \times 10^4$ $TCID_{50}$, en el día 31 pi (**Fig. IV.3A**). Sin embargo, ese incremento fue más sutil en el tanque de densidad media-baja, que mostró valores similares a los iniciales hasta el día 31 pi, y alcanzó su máximo en el día 32 (5×10^{10} copias/g y $1{,}33 \times 10^5$ $TCID_{50}$/g) (**Fig. IV.3B**). La carga viral en los supervivientes, tanto en número de copias como la cantidad de partículas virales infectivas) fue similar al de los individuos muertos a lo largo del experimento.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

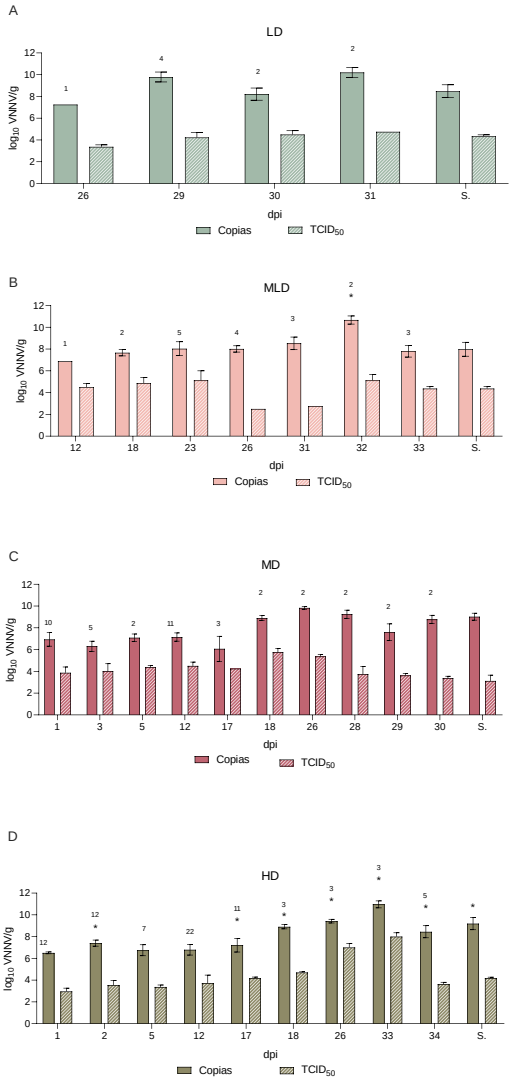


Figura IV.3. Log_{10} del número de copias de VNNV y del $TCID_{50}$ en los peces muertos y en los supervivientes (S.) de los grupos de **A**) densidad baja (LD), **B)** densidad media-baja (MLD), **C)** densidad media (MD) y **D)** densidad alta (HD). Las bajas se analizaron individualmente y los supervivientes en lotes de 3 individuos. El número de peces analizados se indica encima de cada barra. Las barras de error representan el promedio y la desviación estándar, y los asteriscos las diferencias significativas en la carga viral con respecto a las primeras bajas de cada grupo (p valor < 0,05).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

En cuanto a los grupos de alta y media densidad (HD y MD, respectivamente), los individuos que murieron en el primer día pi contenían alrededor de 6×10^6 copias de ARN1/g (2×10^3 $TCID_{50}$/g). La carga viral aumentó con el tiempo en ambos grupos, alcanzando su máximo en el tanque MD el día 26 pi ($6{,}31 \times 10^9$ copias/g y 2×10^5 $TCID_{50}$/g) (**Fig. IV.3C**) y en el tanque HD el día 33 pi ($9{,}25 \times 10^{10}$ copias/g y 10^8 $TCID_{50}$/g) (**Fig. IV.3D**). Además, la carga viral en los peces del grupo de alta densidad mostró una ligera disminución en los últimos días del experimento. En los supervivientes de los grupos MD y HD, la cuantificación de carga viral fue también similar a la detectada en la mayoría de los peces muertos.

4.3.3. Carga viral en los peces muestreados durante el experimento (copias ARN1/g y $TCID_{50}$/g)

Los muestreos periódicos evidenciaron una carga viral similar en todos los grupos en los primeros días de la infección, como se muestra en la **Fig. IV.4**. Sin embargo, el progreso de la infección mostró diferencias importantes, ya que la carga viral al final del ensayo fue significativamente más alta (especialmente en lo que respecta a partículas viables) en los grupos de alta y media densidad (HD: $3{,}1 \times 10^6$, MD: $2{,}1 \times 10^5$ $TCID_{50}$), que en los grupos de densidad media-baja y baja (alrededor de 10^3 $TCID_{50}$).

También se observaron diferentes tendencias en la replicación del VNNV entre los grupos a lo largo del ensayo. Así, en los lenguados pertenecientes al grupo de baja densidad (**Fig. IV.4A**), se detectó un aumento progresivo en la carga viral hasta los 15 – 20 dpi ($1{,}5 \times 10^8$ copias de ARN1 / 8×10^5 $TCID_{50}$), y posteriormente una disminución al final del experimento (25 dpi; $3{,}3 \times 10^7$ copias y 10^3 $TCID_{50}$). En los grupos de densidad media y media-baja (**Fig. IV.4B-C**), la carga viral alcanzó su punto máximo en torno a los 7-10 dpi (MD: $2{,}3 \times 10^8$ copias / $5{,}6 \times 10^6$ $TCID_{50}$; MLD: $3{,}2 \times 10^{10}$ copias / 5×10^7 $TCID_{50}$) para, a continuación, disminuir hasta el día 25 y aumentar de nuevo hacia el final del experimento.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

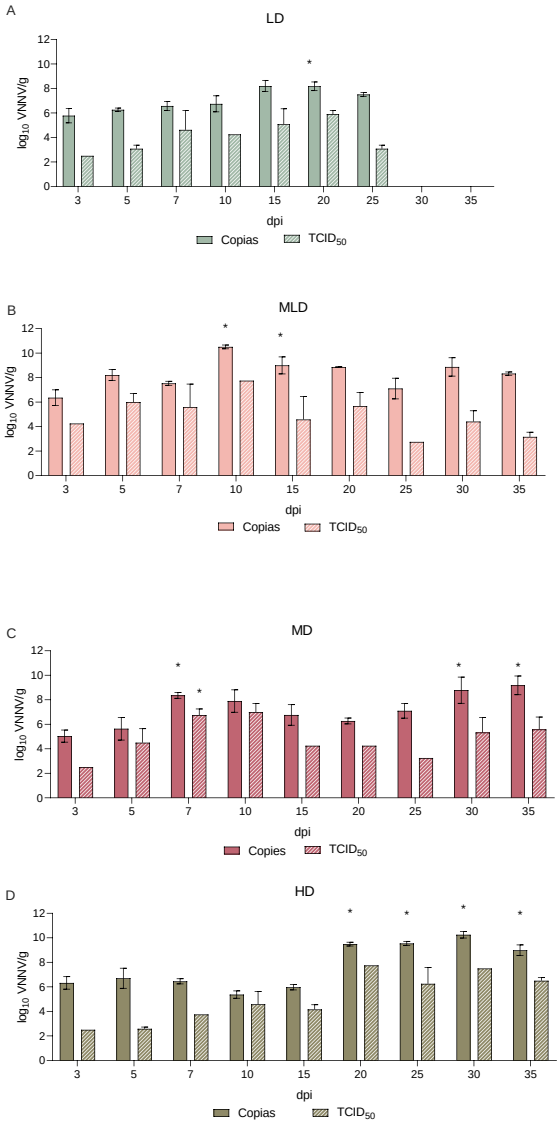


Figura IV.4. Log_{10} del número de copias de VNNV y del $TCID_{50}$ en los peces muestreados de los grupos de densidad baja (LD) **(A),** media-baja (MLD) **(B),** media (MD) **(C)** y alta (MD) **(D)**, en los diferentes puntos de muestreo. Las barras de error representan el promedio y la desviación estándar de los tres peces analizados en cada punto. Los asteriscos indican las diferencias significativas en la carga viral de cada grupo con respecto a las muestras de 3 dpi (p valor < 0,05).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

En el tanque HD (**Fig. IV.4D)**, los peces muestreados hasta los 15 dpi contenían un número similar de copias de ARN1, aunque se observó un ligero aumento de las partículas viables hasta el día 10. A los 20 dpi, la replicación viral aumentó de forma repentina, con incrementos de hasta 3 log tanto en el número de copias de ARN como en las partículas viables (6×10^9 y 3×10^7, respectivamente). Sin embargo, mientras que los valores de ARN se mantuvieron similares hasta el final del experimento ($9{,}8 \times 10^8$), el número de partículas viables sufrió un descenso de alrededor de 1 log.

4.3.4. Carga viral en el agua de cultivo

La carga viral inicial en el agua de cultivo, medida a 1 hpi, fue muy similar en todos los grupos de densidad, con una media de $1{,}5 \times 10^5$ copias de ARN/ml y 10^2 - 10^3 $TCID_{50}$/ml. Sin embargo, se observaron diferencias entre los grupos en los sucesivos días.

En el grupo de menor densidad (LD), tanto el número de copias como el título disminuyeron gradualmente hasta el día 5 pi (10^3 y $5{,}6 \times 10^1$, respectivamente), si bien a los 7 dpi se observó un ligero aumento en el número de copias hasta $1{,}2 \times 10^4$ que se mantuvo en valores similares, con pequeñas fluctuaciones hasta el final del experimento (**Fig. IV.5A**). Aunque no fue posible cuantificar el virus viable en todos los puntos de muestreo, al final del experimento (35 dpi) el título viral era de $3{,}1 \times 10^2$ $TCID_{50}$/ml.

La carga viral en el tanque de densidad media-baja (MLD) mostró ciertas oscilaciones durante el experimento con un aumento final del número de copias de ARN1, desde 5×10^4 copias/ml al inicio hasta 10^6 copias/ml al final, pero con valores de $TCID_{50}$ muy similares a los iniciales (**Fig. IV.5B**).

La dinámica del VNNV fue similar en los tanques de media y alta densidad (MD y HD, respectivamente) mostrando un descenso gradual de alrededor de 1,5 – 2 logaritmos hasta el día 10 pi. A continuación, se observó un aumento abrupto a los 15 dpi, con 2×10^6 copias/ml y $4{,}5 \times 10^3$ $TCID_{50}$/ml en promedio, que se mantuvo hasta el final de los ensayos (**Fig. IV.5C-D**).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

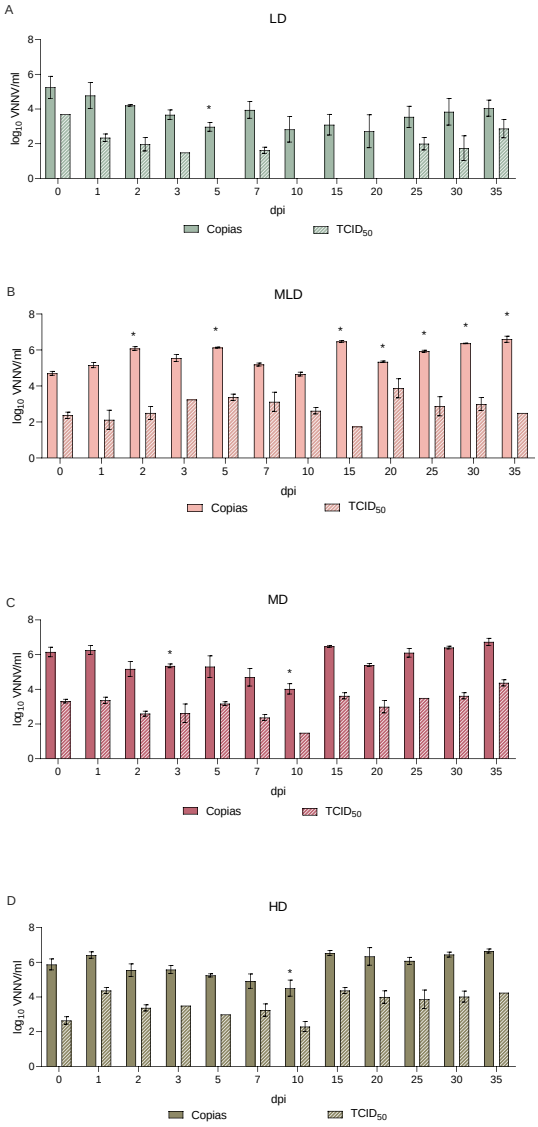


Figura IV. 5. Carga viral (log_{10} del número de copias de VNNV y $TCID_{50}$/ml) en el agua de cultivo de los tanques de densidad baja (LD) **(A),** media-baja (MLD) **(B),** media (MD) **(C)** y alta (MD) **(D),** en los diferentes puntos de muestreo. Las barras de error representan el promedio y la desviación estándar de los tres muestreos realizados en cada punto. Los asteriscos indican las diferencias significativas en la carga viral de cada grupo con respecto a las muestras de 3 dpi (p valor < 0,05).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4.3.5. Concentración de los compuestos derivados del nitrógeno

El agua de los tanques de cultivo no se renovó durante las infecciones experimentales, por lo que también se cuantificó la concentración de compuestos derivados del nitrógeno. Esto podría reducir la carga viral en el agua o inducir daño en los peces, especialmente en los tanques donde el número de individuos era más alto.

En la **Tabla IV.2** se recogen los valores promedio de las concentraciones de amonio y nitrito cuantificadas en los tanques control e infectados. El contenido de nitritos osciló entre 0 y 0,5 mg/l (0-1 mM) en el agua del grupo con menor densidad de peces (LD), mientras que, en los restantes tanques, la concentración aumentó hasta 1 mg/l (20 mM) a los 35 dpi, mostrando un comportamiento similar independientemente de la densidad de peces.

Tabla IV.2. Concentración (mg/l) de nitritos (NO^-_2) y amonio total (TAN) en el agua de cultivo de cada ensayo de densidad.

	LD		MLD		MD		HD	
dpi	NO^-_2	TAN	NO^-_2	TAN	NO^-_2	TAN	NO^-_2	TAN
0	0	0	0	0,5	0	0,5	0	0,5
5	0,25	0,25	0,25	1	0,25	1	0,25	8
7	0,25	0,25	0,25	2	0,25	4	0,25	8
10	0,25	0,5	0,25	2	0,5	4	0,5	8
15	0,25	0,5	0,5	4	0,5	8	0,5	8
20	0,5	0,5	0,5	4	0,5	8	0,5	8
25	0,5	1	0,5	4	1	8	1	8
30	0,5	1	1	8	1	8	1	8
35	0,5	2	1	8	1	8	1	8

La concentración de amonio mostró grandes diferencias entre los cuatro grupos. El tanque de menor densidad de peces (LD) contenía 2 mg/l de TAN al final del experimento, mientras que en los grupos de densidad baja-media (MLD), media (MD) y alta (HD) se alcanzó una concentración de 8 mg/l en los días 30, 15 y 5 dpi, respectivamente. Sin embargo, debido al límite de detección del kit de ensayo, cuyo máximo es 8 mg/l, no se pudo detectar si con el paso del tiempo, la concentración de TAN en el tanque de mayor densidad o en el de densidad media (HD y MD, respectivamente) aumentaba con respecto al tanque de densidad baja-media, que contenía la mitad de los peces.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4.3.6. Expresión de genes relacionados con el estrés

La expresión de los 3 genes evaluados en los peces sacrificados a lo largo del ensayo se mantuvo por debajo de 0,1, independientemente del grupo de densidad de cultivo al que pertenecían (**Tabla IV.3)**. Sin embargo, la transcripción del *hsp*70 y *pepck* en el grupo de mayor densidad (HD), aumentó ligera, aunque no significativamente (0,3 y 0,7 veces, respectivamente) en el día 25 pi.

Tabla IV.3. Magnitud de la expresión (promedio ± SD) de los genes hsp70, gr1 y pepck en los peces sacrificados.

dpi	LD	MLD	MD	HD
*hsp*70				
3	0,05 ± 0,02	0,04 ± 0,02	0,02 ± 0,01	0,04 ± 0,02
5	0,03 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,07 ± 0,03
7	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,03 ± 0,02	0,08 ± 0,03
25	0,04 ± 0,01	0,09 ± 0,05	0,09 ± 0,01	0,29 ± 0,06
*gr*1				
3	0,02 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,00 ± 0,0	0,04 ± 0,01
5	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,05 ± 0,04
7	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,0	0,03 ± 0,02	0,02 ± 0,01
25	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,0	0,06 ± 0,04	0,07 ± 0,03
pepck				
3	0,03 ± 0,02	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,08 ± 0,03
5	0,02 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,07 ± 0,04	0,18 ± 0,12
7	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,06 ± 0,03	0,03 ± 0,01
25	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,01	0,11 ± 0,07	0,69 ± 0,24

Los valores de transcripción de estos genes en los peces sacrificados fueron ligeramente superiores que en las bajas producidas durante el experimento (**Tabla IV.4**). El grupo de mayor densidad (HD) mostró valores de expresión génica considerablemente elevados con respecto a los restantes grupos. Este incremento fue alto en los genes *pepck* y *gr*1, con valores 3,36 y 3,20 veces superiores al control, respectivamente, y moderado en el gen hsp70 (1,7 veces).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla IV.4. Magnitud de la expresión (promedio ± SD) de los genes hsp70, gr1 y pepck en los peces muertos.

dpi	LD	MLD	MD	HD
hsp70				
1			0,61 ± 0,20	0,41 ± 0,13
5			0,81 ± 0,33	0,89 ± 0,19
18		0,34 ± 0,14	0,87 ± 0,16	0,51 ± 0,12
26	0,14 ± 0,01	0,29 ± 0,07	0,29 ± 0,05	1,70 ± 0,14
gr1				
1			0,41 ± 0,29	0,22 ± 0,17
5			0,12 ± 0,07	0,07 ± 0,08
18		0,48 ± 0,15	0,01 ± 0,02	0,05 ± 0,03
26	0,01 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,02 ± 0,00	3,20 ± 0,33
pepck				
1			0,25 ± 0,13	0,82 ± 0,52
5			0,31 ± 0,27	0,18 ± 0,13
18		0,84 ± 0,51	0,95 ± 0,53	0,07 ± 0,03
26	0,03 ± 0,02	0,05 ± 0,01	0,03 ± 0,01	3,36 ± 1,00

4.4. Discusión

El aumento del número de peces por unidad de volumen o superficie, ligado a la intensificación de los cultivos, favorece la propagación de patógenos mediante transmisión horizontal y puede inducir un estado de estrés por hacinamiento o por el deterioro en la calidad del agua (Krkošek, 2010) Iguchi y col., 2003; Salas-Leiton y col., 2010; Sánchez y col., 2010; Yarahmadi y col., 2016). Por tanto, en este capítulo se ha evaluado el efecto de diferentes densidades de cultivo sobre la evolución de la infección por VNNV en lenguado y, de forma secundaria, aunque no menos importante, se ha monitorizado la expresión de genes relacionados con la respuesta al estrés.

En primer lugar, una de las principales consecuencias de la cría de peces a altas densidades de población son los episodios de mortalidad. Se ha descrito una correlación positiva entre la densidad de cultivo y la mortalidad en peces planos como la platija japonesa, el lenguado o la platija fina (*Paralichthys adspersus*) (Castro y col., 2019; Costas y col., 2008). Sin embargo, en nuestro ensayo sólo se registró una mortalidad del 2 % en el grupo control de mayor densidad (HD).

En cuanto a los peces infectados, sí se observó un porcentaje mayor de mortalidad acumulada a medida que se aumentó la densidad de cultivo. El

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

grupo de menor densidad registró un 27 % de mortalidad al final del ensayo, mientras que las bajas aumentaron de forma considerable en el grupo de densidad baja-media (46 %). Este incremento fue significativamente superior en los tanques de densidad media y alta (MD: 67 %; HD: 73 %). A este respecto, cabe señalar que los dos grupos de densidad media compartían el mismo número de peces por unidad de superficie (0,071 g/cm^2), pero diferían en el número de individuos por volumen de agua (MD: 5 g/l y MLD: 1 g/l). Esto sugiere que el volumen de agua es también un parámetro importante para tener en cuenta en el cultivo de lenguado, al igual que en los peces de simetría bilateral, si bien la mayoría de los estudios sobre peces planos proporcionan datos de densidad basados únicamente en la superficie de cultivo (Castro y col., 2019; Costas y col., 2008; Sammouth y col., 2009).

Costas y col. (2008) establecieron en 0,9 g/cm^2 el límite superior para una densidad óptima de cultivo de lenguado. Sin embargo, nuestros resultados indican que el cultivo de juveniles de lenguado infectados por VNNV a densidades de 0,071 g/cm^2 (grupo MLD) induce un aumento significativo en la mortalidad. También observamos que una densidad de población elevada, tanto en función de la superficie como del volumen de agua (0,071 g/cm^2 y 5 g/l, grupo MD), provoca un aumento en los valores de mortalidad. Por tanto, el cultivo a altas densidades de lenguados infectados por VNNV reduce la supervivencia.

El efecto de la densidad de cultivo en la replicación del VNNV se analizó mediante cuantificación de las copias genómicas del ARN1 y titulación en diferentes puntos del experimento. Al inicio del ensayo, la carga viral era similar en todos los grupos, pero con el progreso del experimento se evidenciaron algunas diferencias. A partir del día 20 pi, los niveles más altos de virus viable se observaron en los peces pertenecientes al grupo de mayor densidad (HD). En cuanto al número de copias de ARN1, los valores en los grupos de densidad media y media-baja fueron elevados, aunque no tanto como en el grupo de alta densidad (HD). Las diferencias entre partículas viables ($TCID_{50}$) y número de copias de ARN en el mismo punto de muestreo oscilaron entre 1 y 5 log dependiendo del ensayo, especialmente en los grupos de densidad baja, media y media-baja. Esta diferencia fue menor en el grupo de alta densidad (HD), lo que parece indicar que las densidades elevadas

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

favorecen una replicación efectiva, con la producción de partículas virales infectivas, mientras que a densidades inferiores podría producirse un mayor número de partículas virales defectivas, como se ha propuesto en la replicación de cepas de VNNV en diferentes especies (Souto y col., 2015a).

La información de carga viral en los peces muestreados se complementó con los datos obtenidos a partir de las bajas recogidas a lo largo del ensayo, aunque en los primeros días de la infección, solo hay datos disponibles para los grupos MD y HD (las mortalidades en los otros dos grupos se registraron por primera vez a los 12 y 26 dpi). La carga viral en los peces muertos entre los días 1 a 5 pi fue similar en ambos grupos, aunque en el MD fue más de un logaritmo superior a la detectada en los peces muestreados. A los 26 dpi, cuando se pudieron comparar los datos de carga viral en los peces muertos de los cuatro grupos, los valores de $TCID_{50}$ correspondientes a los peces de los grupos MD y HD superaron en más de 2 logaritmos a los del grupo LD, lo que corrobora los resultados obtenidos con los peces muestreados. Además, el virus viable presente en las muestras de agua fue, en promedio, 1 log más alto en los grupos de densidad media y alta que en los otros dos.

Los resultados discutidos en los párrafos anteriores sugieren que las condiciones de alta densidad de población favorecen la replicación viral, lo que podría explicar el aumento de la mortalidad observada. Se han descrito unos resultados similares en infecciones causadas por otros virus de peces, como el ranavirus de la lubina negra (Inendino y col., 2005), el virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (IHNV; Ogut y Reno, 2004) o el *Golden Shiner Virus* (GSV) (Schwedler y Plumb, 1982).

Por otra parte, la densidad de cultivo ensayada en este estudio, especialmente la denominada alta (HD), podría considerarse como un factor de estrés para los peces. La respuesta al estrés se inicia con la activación del eje HPI, y como resultado se produce la liberación de cortisol en las células interrenales, que a su vez actúa modulando la expresión de genes como el *hsp*70, *gr*1 o *pepck* (Kim y col., 2013; Samaras y col., 2018). Por tanto, se cuantificó la transcripción de estos tres biomarcadores para analizar la implicación del estrés por hacinamiento en las mortalidades detectadas. Además, las proteínas de choque térmico funcionan como chaperonas

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

moleculares que reflejan el daño celular provocado por el estrés químico que supone la exposición a elevados niveles de nitritos (Ciji y Akhtar, 2020). Tanto la expresión del gen *hsp*70 como de los receptores de glucocorticoides (*gr*1) se han visto alterados en el área preóptica del hipotálamo de lubinas y doradas sometidas a estrés por hacinamiento (Samaras y col., 2018). La sobreexpresión del gen *hsp*70 también se ha observado en hígado y músculo de lenguado senegalés ante diferentes agentes estresantes (Cordeiro y col., 2012; Gónzalez-Mira y col., 2016; Salas-Leitón y col., 2010). En cuanto a la expresión del gen *gr*1en peces cultivados a altas densidades, se ha observado una regulación a la baja en hígado de adultos de pez globo de río (*Takifugu obscurus*) y de alevines de lubina (Kim y col., 2013; Terova y col., 2005), y al alza en el músculo esquelético de juveniles de trucha arcoíris (Valenzuela y col., 2020). Asimismo, se ha descrito la sobreexpresión del gen *pepck* en hígado y cerebro de individuos adultos del pez globo de río criados a alta densidad (Kim y col., 2013).

En nuestro trabajo, a diferencia de lo descrito en estas publicaciones, los lenguados sacrificados a lo largo del experimento no mostraron diferencias significativas en la transcripción de estos biomarcadores con respecto a los peces del grupo LD, sugiriendo que las condiciones utilizadas no provocaron estrés. La diferencia con respecto a los trabajos citados anteriormente podría deberse, por un lado, a la mayor tolerancia al estrés de los peces planos y a los diferentes tamaños o estados de desarrollo de los peces (Cordeiro y col., 2012; Costas y col., 2018; Salas-Leiton y col., 2010). Sin embargo, en las bajas registradas en el grupo de alta densidad sí se detectó cierta sobreexpresión de los 3 genes que podría deberse a una respuesta a la replicación del virus, ya que la carga viral observada en este grupo fue mayor que en los restantes. De hecho, la infección por VNNV se ha relacionado previamente con la sobreexpresión del gen *hsp*70 en células epiteliales de perca gigante (*Lates calcarifer*) (Liu y col., 2016a,b) y con otros genes relacionados con el estrés en juveniles de lubina, especialmente en el cerebro, como las lectinas tipo C o el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (Lama y col., 2020).

Por otra parte, la calidad del agua de cultivo empeoró a lo largo de los ensayos por la presencia de compuestos derivados del nitrógeno, como el

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

amonio, que es la principal molécula producida a partir los desechos de los peces y la descomposición del pienso no consumido (Hrubec y col., 1996), y los nitritos, que se forman por la oxidación del amonio llevada a cabo por bacterias del género *Nitrosomonas* o *Nitrospira* (Ciji y Akhtar, 2020). Por tanto, se evaluó la concentración de ambos compuestos en el agua, y se observó un incremento paralelo al incremento de la densidad de cultivo, lo que concuerda con los resultados obtenidos por Hong y col. (2019) en alevines de palometa blanca cultivados en condiciones simuladas de hacinamiento por transporte.

La presencia en el agua de cultivo de altas concentraciones de estos compuestos puede alterar la salud y el bienestar de los peces, aunque afectan de forma diferente a especies de agua dulce y salada. El amonio presenta baja toxicidad en agua dulce ya que las membranas biológicas son prácticamente impermeables a este compuesto (da Costa y col., 2019). Sin embargo, las especies de ambiente marino son las más sensibles, y sufren lesiones en el hígado, branquias y músculo debido al estrés oxidativo (Randall y Tsui, 2002). En nuestro trabajo, los peces no mostraron signos de enfermedad diferentes a los que suele causar la infección por el VNNV ni se observaron lesiones superficiales en los órganos internos. Sin embargo, no podemos descartar que se hayan producido daños oxidativos en el interior de los tejidos u órganos ya que no se realizaron análisis histopatológicos.

La toxicidad producida por el nitrito es dependiente de la duración de la exposición al agente químico y el tamaño y edad del pez, siendo más susceptibles los peces adultos (Ciji y Akhtar, 2020). Resulta especialmente grave en aquellas especies con un elevado número de células del cloro o ionocitos, como la trucha arcoíris (Deane y Woo, 2007). En agua de mar es menos tóxico que en agua dulce, ya que los peces son hipoosmóticos con respecto al ambiente, aunque también se han observados efectos adversos en peces marinos expuestos a altas concentraciones de nitrito. Estos efectos incluyen una reducción en la tasa de crecimiento y en la alimentación, y un incremento en la susceptibilidad a las infecciones debido a la reducción de la actividad de la lisozima y la IgM (Ciji y Akhtar, 2020). También se ha observado un incremento en la concentración de metahemoglobina circulante, lo que a su vez induce un estado de hipoxia que resulta en estrés fisiológico

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

(Jia y col., 2015). Así, se ha descrito un incremento en la metahemoglobina circulante seguido de la sobreexpresión del gen *hsp*70 en rodaballo y dorada plateada (*Sparus sarba*) expuestos a concentraciones crecientes de nitritos (Deane y Woo, 2007; Jia y col., 2015, 2016). Sin embargo, los valores de transcripción del gen *hsp*70 obtenidos en nuestro trabajo fueron especialmente bajos en los tanques con mayores concentraciones de nitritos (20 mM; grupos MLD, MD y HD), lo que confirma las observaciones realizadas por Ciji y Akhtar (2020) sobre el mayor grado de tolerancia a los nitritos de los peces jóvenes.

Por último, también se evaluó la dinámica del VNNV en los tanques de cultivo. Al inicio de los ensayos, las partículas virales adheridas a la superficie del cuerpo de los peces infectados mediante inmersión se liberaron al agua, permitiendo detectar una carga viral elevada (alrededor de $10^5 – 10^6$ copias del VNN/ml y $10^2 – 10^3$ $TCID_{50}$/ml) en todos los tanques. Tanto las copias genómicas como el título disminuyeron progresivamente hasta el día 10 pi, especialmente en los tanques de alta y media densidad, hasta valores muy inferiores a los iniciales. Este descenso de la carga viral sugiere que durante los primeros días de infección no se produce liberación de partículas virales desde los peces infectados, tal y como indicaron Souto y col. (2018a). A partir del día 10 pi, se produjo un incremento en la carga viral hasta el final de los experimentos en los grupos de densidad alta y media, pero no en los grupos de densidad baja y media-baja. Sin embargo, la carga viral en el grupo MLD se mantuvo elevada a lo largo del ensayo, lo que podría deberse a que, aunque la relación número de peces por volumen de agua era la misma que en el grupo LD, había un número mayor de peces potencialmente liberadores del virus. Además, el aumento de la carga viral observado en los grupos MD y HD coincidió con la aparición de los signos clínicos y la fase de mortalidad aguda, lo que sugiere una posible correlación entre la carga de VNNV en el agua y los picos de mortalidad. Esta correlación se describió también en la infección de mero carcelario y perca gigante con una cepa RGNNV (Jaramillo y col., 2017).

En resumen, nuestros datos indican que las altas densidades de cultivo en lenguado provocan un inicio más temprano de la mortalidad y reducen las posibilidades de que el individuo sobreviva a la infección por VNNV.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

CAPÍTULO V. TRANSMISIÓN DEL VNNV ENTRE LENGUADOS Y DORADAS, Y EFECTO DEL ESTRÉS EN LA INFECCIÓN

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

CAPÍTULO V. TRANSMISIÓN DEL VNNV ENTRE LENGUADO Y DORADA, Y EFECTO DEL ESTRÉS EN LA INFECCIÓN

5.1. Introducción

Como se comentó en el capítulo anterior, la acuicultura ha desarrollado técnicas de cultivo intensivas para obtener el máximo rendimiento a partir de los recursos disponibles. Entre ellas se encuentra el policultivo, un procedimiento innovador que consiste en la cría de diferentes especies de invertebrados y/o peces cohabitando en la misma zona, y que proporciona tanto beneficios económicos como una mejor calidad del producto (Stickney, 2013). La dorada y el lenguado son dos especies en las que se han hecho ensayos de cultivo utilizando esta estrategia de cohabitación (Ferreira y col., 2010), y además, también dos de las especies con la mayor tasa de producción en la acuicultura mediterránea (FAO, 2020). Sin embargo, el policultivo puede suponer una seria amenaza para la producción debido a la introducción o propagación de patógenos, como el VNNV, mediante transmisión horizontal (FAO, 2020; Rodgers y col., 2011).

La transmisión horizontal del VNNV ocurre comúnmente entre individuos enfermos y sanos pertenecientes a la misma especie, tal y como se describió en lubina y lenguado (Péducasse y col. 1999, Souto y col., 2015a). Hick y col. (2011) observaron transmisión horizontal mediante el agua de cultivo entre dos lotes de perca gigante cultivados en tanques separados, y, recientemente, también se ha descrito la transmisión del VNNV entre diferentes granjas de cultivo de lubina en Croacia, por el movimiento de stocks portadores (Zrncic y col., 2022). Sin embargo, el VNNV también se puede transmitir entre especies diferentes, como es el caso de la lubina y la dorada tanto en granjas de cultivo como en condiciones experimentales (Castric y col., 2001; Volpe y col., 2020), o el bacalao y el rodaballo (Korsnes

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

y col., 2012). Asimismo, la perca gigante y el mero manchado también desarrollaron la infección tras la inmersión en un agua en la que se había disuelto un homogeneizado de tejido infectado perteneciente a la otra especie (Manin y Ransangan, 2011).

Por otra parte, el cultivo mediante cohabitación también puede desencadenar situaciones de estrés debido al contacto entre especies con diferentes patrones de comportamiento. Como se describió en el capítulo anterior, estas condiciones deterioran la salud de los peces, y reducen las posibilidades de superar una posible infección (Kristiansen y col., 2020). Por tanto, el objetivo de este capítulo es estudiar la transmisión interespecífica del VNNV entre ejemplares de dorada y lenguado, y evaluar el efecto del estrés de la cohabitación en el resultado de la infección.

5.2. Material y métodos

5.2.1. Ensayos de infección en peces

Las infecciones experimentales se realizaron con un total de 846 individuos juveniles de lenguado senegalés y de dorada (423 de cada especie) con peso medio 1 g, mediante inmersión y cohabitación. Los peces se mantuvieron en tanques opacos de 50 l y se aclimataron a 25 ºC durante 14 días (L12:D12) en las instalaciones del acuario de la Universidad de Santiago de Compostela, incrementando la temperatura a razón de 1ºC/día. Además, también se descartó la presencia de patógenos virales y bacterianos, siguiendo el proceso descrito en el apartado 1.2.7.

Los ensayos de infección se realizaron como se describe a continuación:

- Ensayo de susceptibilidad (infección por baño). Un total de 210 lenguados y 210 doradas se infectaron con 10^5 $TICD_{50}$/ml de las cepas Ss160.03 o Sa382.17, descritas en el capítulo I, mediante inmersión en un baño durante 5 horas y fuerte aireación. Tras la infección, los peces se dividieron de forma aleatoria en 3 grupos réplica de 35 peces/tanque para cada infección experimental. El experimento finalizó a los 35 dpi.

- Ensayos de transmisión interespecífica (infección mediante cohabitación). Se utilizaron un total de 360 peces (180 de cada especie). Para cada experimento de cohabitación, 90 lenguados y 90 doradas se infectaron

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

por baño durante 5 horas con la cepa Ss160.03 (**Fig. V.1A**) y Sa382.17 (**Fig. V.1B**), respectivamente, a una concentración de 10^5 $TCID_{50}$/ml. Al igual que en el ensayo anterior, los peces de cada especie se distribuyeron de forma aleatoria en 3 tanques réplica con 30 peces/tanque. A las 48 hpi, se introdujeron 30 doradas o lenguados sanos en cada uno de los tanques para cohabitar con los lenguados y doradas infectados, respectivamente. Los ensayos se terminaron tras 33 días post cohabitación (dpc) o 35 dpi.

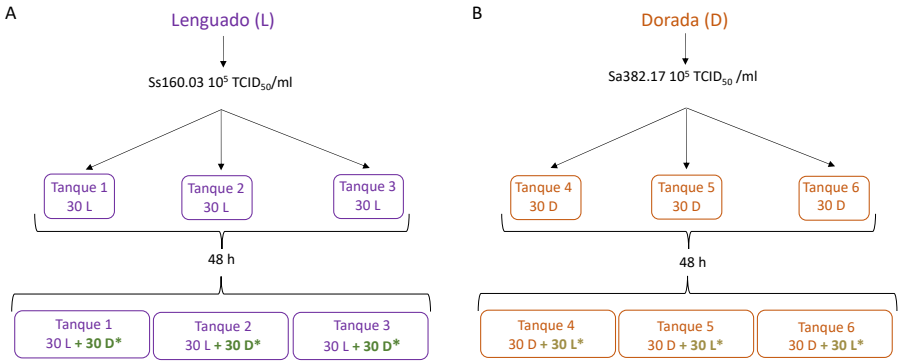


Figura V.1. Esquema de la cohabitación de A) lenguados infectados con la cepa Ss160.03 y doradas sanas, y B) doradas infectadas con la cepa Sa382.17 y cohabitando con lenguados sanos.

También se estableció un grupo control por cada especie, compuesto únicamente por 15 individuos para reducir el número de peces, en el que se utilizó medio de cultivo L-15 para el baño, y un control de cohabitación, utilizando 15 peces de cada especie. Ambos controles se manipularon como los grupos infectados, siguiendo las condiciones descritas en la infección por baño.

Los peces se controlaron diariamente para registrar los signos clínicos y la mortalidad. Las bajas producidas durante el experimento se retiraron de los tanques y se almacenaron a -20 ºC hasta el análisis virológico, mientras que los peces supervivientes se sacrificaron utilizando una sobredosis del anestésico MS-222.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5.2.2. Análisis virológico y cuantificación viral

El análisis virológico se realizó a partir del tejido cerebral y ocular de las bajas recogidas durante el experimento, que se procesaron de forma individual siguiendo el proceso descrito en el apartado 1.2.3. También se analizaron los peces supervivientes (S) de las infecciones experimentales y los controles.

5.2.3. Expresión del gen *hsp*70

La transcripción del gen *hsp*70 se cuantificó en los peces sometidos a los ensayos de cohabitación. Además, también se analizaron dos lenguados muertos y dos doradas sacrificadas del control de cohabitación. El protocolo para cuantificar la expresión génica es el descrito en el apartado 4.3.6.

5.2.4. Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron según el apartado 1.2.9.

5.3. Resultados

5.3.1. Curvas de mortalidad en los ensayos de susceptibilidad de dorada y lenguado

Las 2 especies mostraron unos valores de mortalidad moderados en la infección con ambas cepas de VNNV. Los porcentajes más altos de mortalidad se registraron en los peces infectados con el aislado de lenguado (Ss160.03) a los 35 dpi, con valores del 55% en dorada y 52% en lenguado (**Fig. V.2**). La infección con el aislado de dorada (Sa382.17) causó una mortalidad ligeramente inferior, con aproximadamente un 47% en las doradas y un 40% en los lenguados (**Fig. V.3**). Los valores de mortalidad provocados por ambas cepas de VNNV fueron significativamente superiores ($p = 0,01$) a los observados en los grupos control (GC), en los que se registró al final del experimento una mortalidad inferior al 10%.

Las primeras bajas provocadas por las dos cepas de VNNV se produjeron en la dorada a los 8 dpi. En el lenguado, la mortalidad no se observó hasta los 14 y 15 dpi, en los individuos infectados con la cepa Sa382.17 y Ss160.03, respectivamente. Además, aunque en ambas especies se registraron bajas hasta los 35 dpi, se decidió finalizar el ensayo en ese punto debido al empeoramiento de las condiciones del agua de cultivo.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

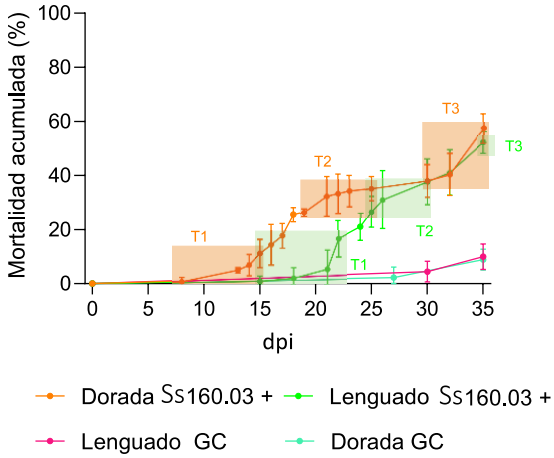


Figura V.2. Curvas de mortalidad acumulada en los peces infectados con la cepa Ss160.03. GC: grupo control bañado con medio de cultivo L-15. Los datos representan el promedio y desviación estándar de las 3 réplicas. Los recuadros indican las 3 fases de mortalidad: T1, fase inicial; T2, fase aguda; T3, fase final.

En cuanto a los signos de ERV, los lenguados infectados mostraron un comportamiento de natación anormal, con movimientos en bucles y descanso boca arriba, desde el día 7 pi, mientras que las doradas murieron sin mostrar signos evidentes de ERV.

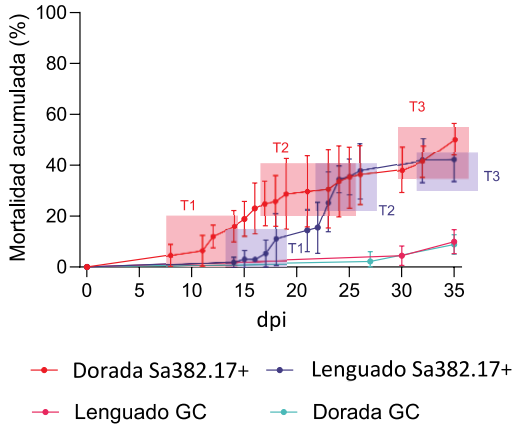


Figura V.3. Curvas de mortalidad acumulada en los peces infectados con la cepa Sa382.17. GC: grupo control bañado con medio de cultivo L-15. Los datos representan el promedio y desviación estándar de las 3 réplicas. Los recuadros indican las 3 fases de mortalidad: T1, fase inicial; T2, fase aguda; T3, fase final.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5.3.2. Cinética de replicación del VNNV en las doradas y lenguados infectados en los ensayos de susceptibilidad

Los peces muertos se analizaron en grupos de 9 individuos de acuerdo con la fase de mortalidad (T1: mortalidad inicial, T2: aguda y T3: tardía).

La replicación de ambas cepas de VNNV fue más eficiente en los lenguados que en las doradas, ya que se detectó un número significativamente mayor de copias de ARN viral (valor p < 0,05) (**Fig. V.4**). Los lenguados infectados mostraron una carga viral media inicial en torno a 10^9 copias de ARN1/g de pez independientemente de la cepa de VNNV utilizada en la infección ($7{,}76 \times 10^8$ y $1{,}48 \times 10^9$ copias ARN1/g, en los peces infectados con Ss160.03 y Sa382.17, respectivamente). Esta carga viral disminuyó en la última fase de mortalidad (T3) hasta $3{,}55 \times 10^7$ y $3{,}24 \times 10^7$ copias ARN1/g, en la infección con las cepas Ss160.03 y Sa382.17, respectivamente. En las doradas se detectó una carga viral similar en todas las fases analizadas, con una media de $2{,}1 \times 10^5$ copias de ARN1/g independientemente de la cepa (valores medios de T1: $5{,}25 \times 10^5$ y $3{,}24 \times 10^4$; T2: $1{,}26 \times 10^5$ y $3{,}02 \times 10^5$; T3: $1{,}32 \times 10^5$ y $6{,}76 \times 10^4$ copias de ARN1/g en los peces infectados con Ss160.03 y Sa382.17, respectivamente).

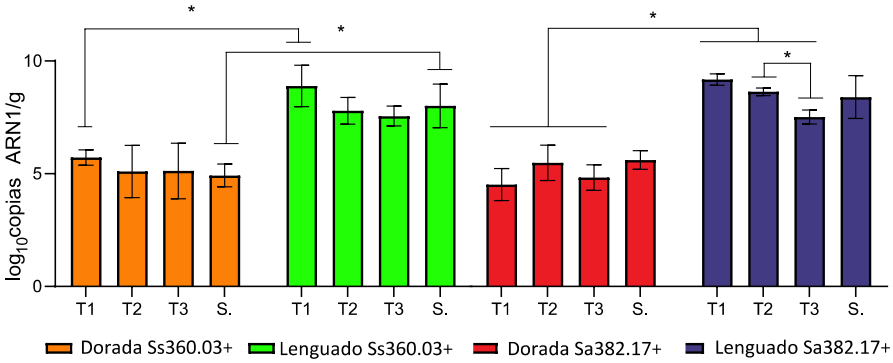


Figura V.4. Cuantificación de carga viral (log_{10} copias ARN1/g de pez) en los peces de los ensayos de susceptibilidad, en los estados de mortalidad temprana (T1), aguda (T2) y tardía (T3). Las barras indican la media ± SD (N=9). Los asteriscos representan diferencias significativas (p valor < 0,05).

En ambas especies, la carga viral en los peces supervivientes fue similar a la de las bajas (valor p > 0,05). Además, se recuperaron partículas virales

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

infectivas en cultivo celular de todas las muestras obtenidas en los 4 ensayos de infección.

5.3.3. Ensayos de transmisión interespecíficos

5.3.3.1. Cohabitación 1: lenguados infectados cohabitando con doradas sanas

El comportamiento de los lenguados infectados con la cepa Ss160.03 se alteró de forma repentina después de introducir en los tanques el lote de doradas: abandonaron su estado de reposo en el fondo del tanque, para mostrar una natación rápida y agitada, tratando de escapar de la persecución y los ataques de las doradas. Sin embargo, a pesar de estos ataques, no mostraron daños o heridas externas. El inicio de la mortalidad se produjo en el día 1 post cohabitación (pc), es decir, el tercer día pi, y alcanzó el 50% de bajas a los 10 dpc (12 dpi). Ningún lenguado sobrevivió más allá del día 21 pc (23 dpi). En cuanto a las doradas cohabitantes, las primeras bajas (2%) se observaron en el día 6 pc. A los 28 dpc, el 50% de los individuos habían muerto, y la mortalidad alcanzó el 78% al final del experimento (33 dpc) (**Fig. V.5**).

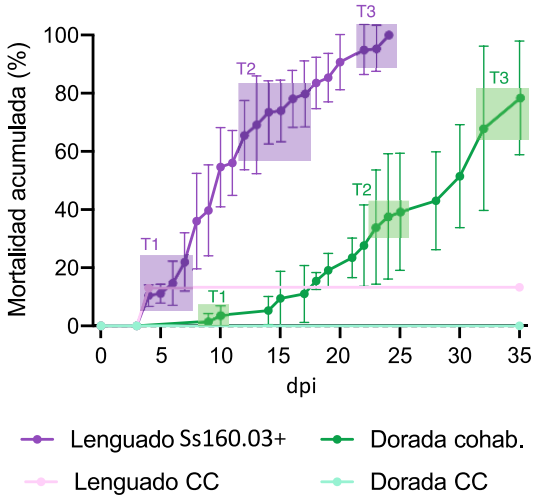


Figura V.5. Curvas de mortalidad acumulada (%) en el ensayo de transmisión interespecífica, utilizando lenguados infectados con la cepa Ss160.03 y doradas sanas como cohabitantes, y los peces utilizados como control de cohabitación (CC). Los datos representan el promedio y desviación estándar de las 3 réplicas. Los recuadros indican las 3 fases de mortalidad: T1, fase inicial; T2, fase aguda; T3, fase final.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Los lenguados mostraron los signos típicos de ERV, incluyendo un comportamiento natatorio errático, a partir del día 6 pc (8 dpi), mientras que en las doradas no se detectaron evidencias de ERV durante el desarrollo del experimento.

Estos datos indican que la cohabitación condujo a un inicio más temprano de la mortalidad en ambas especies con respecto a los ensayos de susceptibilidad descritos previamente, y que, además, los porcentajes de mortalidad también fueron significativamente mayores ($p < 0,01$) que en la infección por baño y en el control de cohabitación (CC).

En cuanto a la curva de replicación del VNNV, el número de copias de ARN1/g en los lenguados infectados en la fase inicial (T1) fue de $9,77 \times 10^7$ y aumentó de forma significativa en las fases siguientes hasta $4,57 \times 10^8$ en la fase T2 y $7,08 \times 10^8$ en la fase T3 (valor de $p < 0,05$). Estos valores de carga viral fueron superiores (en torno a 3 log), con respecto a la detectada en las doradas cohabitantes (**Fig. V.6**), en las que la carga viral promedio fue de $8,18 \times 10^4$ copias VNNV/g (p valor < 0,05).

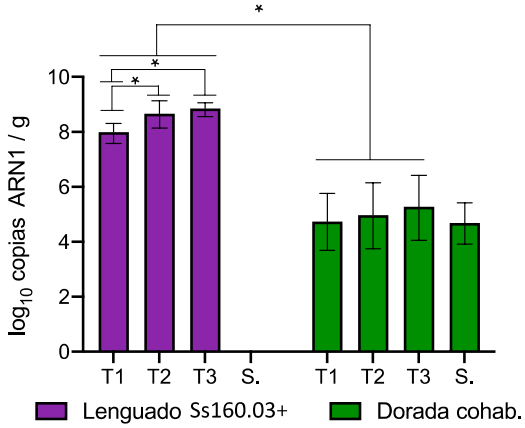


Figura V.6. Carga viral (log_{10} de las copias de ARN1/g) detectada en los lenguados infectados con la cepa Ss160.03 y las doradas cohabitantes en los tres puntos de muestreo analizados, así como en las doradas supervivientes. Cada barra representa el promedio ± SD (N = 9). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (p valor < 0,05).

Sin embargo, la carga de VNNV en ambas especies, y especialmente en las doradas, podría haberse infraestimado ya que la mayoría de los individuos

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

muertos mostraban el cráneo y las cavidades oculares parcialmente vacías debido al comportamiento caníbal de las doradas, que se comieron los tejidos blandos de los individuos muertos.

Por otra parte, la inoculación en cultivo celular de todas las muestras permitió la recuperación de partículas virales infectivas a partir de los peces cohabitantes, demostrando que la cepa Ss160.03 se transmitió de forma efectiva de los lenguados a las doradas sanas cohabitantes. Las muestras correspondientes al grupo control de cohabitación no provocaron ECP en cultivo celular y, por lo tanto, se consideraron negativas.

5.3.3.2. Cohabitación 2: doradas infectadas cohabitando con lenguados sanos

Siguiendo el patrón comportamental descrito en el ensayo de cohabitación 1, las doradas atacaron y persiguieron a los lenguados, inmediatamente después de su introducción en los tanques para realizar la cohabitación, lo que desencadenó una natación agitada y rápida en los lenguados.

En las doradas, la primera baja se registró a los 4 dpc (6 dpi), aunque no mostraron sintomatología de ERV en ningún momento. En el día 18 pc (20 dpi), el porcentaje de mortalidad acumulada alcanzó el 50 % y al final del experimento se registró un 80 % (**Fig. V.7**). La mortalidad en los lenguados comenzó en el primer día pc, aunque los primeros signos de infección, como natación errática en bucles y descanso boca arriba, no se observaron hasta el día 6 pc. El porcentaje de mortalidad acumulada aumentó hasta el 50 % en el día 16 pc y alcanzó valores similares a los de las doradas (82 %) al final del ensayo.

El inicio de la mortalidad en los ensayos de cohabitación fue más temprano que en los ensayos de susceptibilidad. Asimismo, la mortalidad acumulada al final de los ensayos fue significativamente superior en ambas especies con respecto a la infección por baño y al control de cohabitación ($p < 0,01$).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

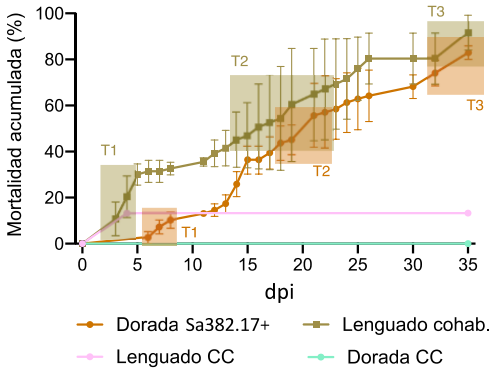


Figura V.7. Porcentaje de mortalidad acumulada en el ensayo de transmisión interespecífica (cohabitación 2), utilizando doradas infectadas con la cepa Sa382.17 y lenguados sanos como cohabitantes, y los peces utilizados como control de cohabitación (CC). Los datos representan el promedio y desviación estándar de las 3 réplicas. Los recuadros indican las 3 fases de mortalidad: T1, fase inicial; T2, fase aguda; T3, fase final.

En cuanto a la replicación del VNNV (**Fig. V.8**), se detectaron ciertas diferencias en el número de copias de ARN1 entre las dos especies. En los individuos de dorada se registró una carga similar durante todo el experimento, de alrededor de 10^5 copias/g, mientras que los lenguados cohabitantes mostraron en la fase T1 una cantidad de ARN1 viral significativamente más baja que las doradas ($1{,}45 \times 10^4$; p valor 0,03). Sin embargo, en las fases posteriores T2 y T3, la carga viral aumentó progresivamente hasta $8{,}32 \times 10^4$ y $4{,}25 \times 10^5$ copias/g, respectivamente. En los peces supervivientes, el número de copias del VNNV fue similar al de los peces muertos en la fase aguda de la mortalidad ($4{,}47 \times 10^5$ copias/g) ya que las diferencias observadas no fueron significativas.

La inoculación de las muestras de los peces infectados y de cohabitantes en cultivo celular permitió la recuperación de partículas virales infectivas, lo que demuestra, al igual que en el ensayo de cohabitación 1, la transmisión del VNNV de la dorada al lenguado. Las muestras pertenecientes al grupo control no mostraron ECP.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

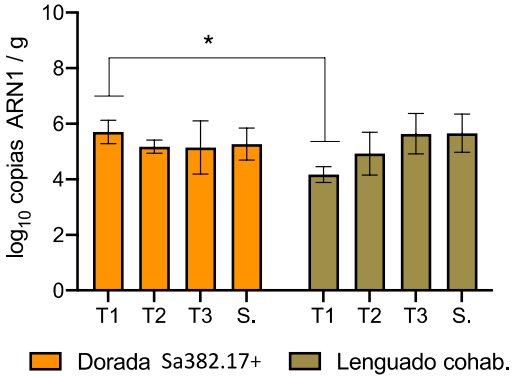


Figura V.8. Carga viral (log_{10} copias de ARN1/g) detectada en las doradas infectadas con la cepa Sa382.17 y los lenguados cohabitantes en los tres puntos de muestreo analizados, así como en los supervivientes de ambas especies. Cada barra representa el promedio ± SD (N = 9). El asterisco indica diferencias estadísticamente significativas (p valor < 0,05).

En el grupo de control de cohabitación también se observó un comportamiento agresivo de las doradas hacia los lenguados, y se registró una mortalidad del 13,3% en los lenguados durante el primer dpc, aunque no se produjeron más muertes en ninguna de las especies, ni se observaron heridas.

5.3.4. Expresión del gen *hsp*70

La cuantificación de este biomarcador de estrés en el experimento de cohabitación 1 (lenguados infectados con doradas sanas), mostró una inducción significativa en los lenguados que murieron en el primer día pc, con valores de expresión de 26,44. En aquellos que sucumbieron a la muerte en los días posteriores, la transcripción disminuyó a valores de 1-1,5 (**Fig. V.9A**).

En los lenguados introducidos como cohabitantes con las doradas infectadas (experimento de cohabitación 2), también se produjo la sobreexpresión en el gen *hsp*70, aunque en menor medida, ya que la magnitud de expresión fue de 7,40 en la primera fase de mortalidad. Estos valores de transcripción disminuyeron a medida que la mortalidad progresaba, pero se mantuvieron ligeramente más altos que en el otro experimento de cohabitación (T2: 5, T3 y supervivientes: 2) (**Fig. V.9B**).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

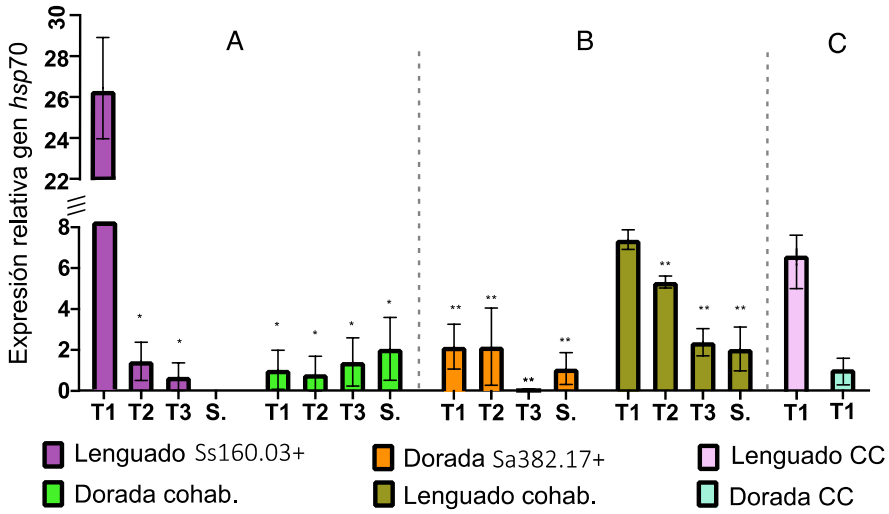


Figura V.9. Expresión relativa del gen *hsp*70 en las muestras de cabeza de los individuos muertos en los ensayos de cohabitación, durante los 3 estados de mortalidad. **A)** Cohabitación 1: lenguados infectados con la cepa 160.03 (T1: 1 dpc; T2:9 dpc; T3: 21 dpc) y doradas cohabitantes (T1: 6 dpc; T2: 20 dpc; T3: 29 dpc). **B)** Cohabitación 2: doradas infectadas con la cepa 382.17 (T1: 4 dpc; T2: 19 dpc; T3: 30 dpc) y los lenguados cohabitantes (T1: 1 dpc; T2: 14 dpc; T3: 30 dpc). **C)** Peces del ensayo de cohabitación control (T1: 1 dpc). Cada barra representa promedio ± SD (N = 9). Las diferencias significativas (p valor < 0,05) se indican con respecto al T1 de los lenguados infectados con la cepa 160.03 (*; A) y con los lenguados cohabitantes (**; B).

También se analizaron los 2 lenguados muertos durante el primer día de cohabitación en el tanque control, y mostraron un aumento de la expresión del *hsp*70, con valores promedio de 6,43 con respecto a los peces que no cohabitaron (**Fig. V.9C)**.

En cuanto a las doradas, la transcripción del gen *hsp*70 se mantuvo en niveles similares a lo largo de todos los ensayos, con valores que oscilaban entre 1 y 2, y no se observaron diferencias significativas con respecto al control de cohabitación.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5.4. Discusión

La dorada y el lenguado son dos especies altamente susceptibles a las cepas recombinantes RGNNV/SJNNV (Olveira y col., 2009; Panzarin y col., 2012; Toffan y col., 2017; Volpe y col., 2020) y con las que se han hecho ensayos de policultivo. Por tanto, para la implementación de esta técnica es de fundamental importancia estudiar la transmisión horizontal del virus entre ambas especies y evaluar el impacto de la cohabitación en el desarrollo de la infección.

En primer lugar, se evaluó la susceptibilidad de juveniles de dorada y lenguado (peso medio 1 g) frente a aislados de VNNV procedentes de las dos especies. Para ello, se realizaron infecciones experimentales mediante inmersión, ya que esta vía de transmisión se aproxima más a la diseminación del virus en la naturaleza (Kim y col., 2018a), y a una temperatura de 25 ºC, que se alcanza con facilidad en el área mediterránea durante el verano, cuando se registran la mayoría de los episodios de ERV (Bandín y Souto, 2020). Se produjeron unos valores de mortalidad moderados/elevados en ambas especies, aunque los valores más altos fueron causados por la cepa Ss160.03 (procedente de lenguado). El porcentaje de mortalidad en los lenguados fue inferior al observado por Souto y col. (2019) en la infección a 22 ºC, mientras que los resultados obtenidos para la dorada solo pueden ser comparados con un brote de VNNV en la naturaleza que afectó a individuos juveniles (Volpe y col., 2020), ya que no hay datos de infecciones experimentales en esta fase de desarrollo del pez. La mortalidad observada en nuestro trabajo fue inferior a la observada por Volpe y col. (2020) (~50 % *vs* 100 %), aunque el hecho de que los peces utilizados por los investigadores italianos fuesen supervivientes de un brote anterior, junto con la mayor temperatura del agua (28 ºC), podrían explicar las diferencias en los valores de mortalidad.

En cuanto a los signos de enfermedad, ninguna de las doradas mostró signos de infección, lo que concuerda con los hallazgos anteriores en larvas y juveniles (Toffan y col., 2017, 2021; Volpe y col., 2020). Por su parte, los lenguados sí mostraron una natación errática desde los primeros días de la infección tal y como se describe en publicaciones anteriores (Souto y col., 2015a).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Los datos de mortalidad registrados, junto la recuperación de partículas virales infectivas en cultivo celular a partir de todos los individuos infectados evidencian que ambas cepas de VNNV pueden causar infección y replicar en las dos especies. Como ya se comentó en el capítulo III, el aislado de dorada puede transmitirse a las larvas de lenguado utilizando nauplios de *Artemia* como vectores mecánicos, causando una alta mortalidad. Sin embargo, otros autores han señalado que las cepas aisladas de dorada causan un porcentaje bajo de mortalidad en lubina (Biasini y col., 2022; Vendramin y col., 2014). Por otra parte, la capacidad de la cepa de lenguado para infectar especies como rodaballo y lubina ya se evaluó con anterioridad, aunque la mortalidad causada en estas especies fue significativamente menor que la observada en lenguado, independientemente de la vía de infección (Souto y col. 2015a, 2016).

A pesar de las evidencias acerca de la posibilidad de que aislados de una especie puedan suponer una amenaza para otras (Biasini y col., 2022; Castric y col., 2001; Korsnes y col., 2012; Volpe y col., 2020), todavía no se ha demostrado la transmisión de una cepa recombinante entre peces infectados y sanos pertenecientes a distintas especies. Los ensayos de cohabitación realizados en este trabajo reflejan la primera evidencia de que la cohabitación de individuos infectados con individuos sanos pertenecientes a otra especie resulta en una mortalidad más temprana y alta que las infecciones por baño (ensayo de susceptibilidad).

El inicio de la mortalidad en el lenguado ocurrió tras solo 1 día de cohabitación (tanto en los cohabitantes infectados como en los sanos) y podría estar relacionado con el cambio de comportamiento observado en los lenguados (natación rápida y agitada) al verse amenazados por las doradas. El comportamiento dominante y agresivo de la dorada hacia los cohabitantes de otra especie es un patrón ya descrito por Kudoh y Yamaoka (2004). Para determinar si la cohabitación con las doradas provocaba estrés fisiológico en los lenguados, se cuantificó la expresión relativa del gen *hsp*70 (Pockley, 2003; Tort y col., 2019). La transcripción de este gen en los lenguados sanos que se introdujeron como cohabitantes con las doradas infectadas mostró niveles elevados en el primer día pc, con una expresión 7,40 veces superior a los peces no cohabitantes, lo que indica que la cohabitación es un factor de

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

estrés para los lenguados, posiblemente debido a los ataques de las doradas. Esta hipótesis está respaldada por los valores similares de transcripción de *hsp*70 obtenidos en los lenguados del grupo control de la cohabitación, así como por trabajos anteriores que muestran un aumento en su expresión en los lóbulos óptico y vagal de la carpa dorada durante la cohabitación con su depredador, el pez sol (*Lepomis macrochirus*) (Kagawa y col., 1999; Kagawa y Mugiya, 2002). La sobreexpresión del gen *hsp*70 fue aún mayor en el lenguado infectado que murió en el primer día de cohabitación (26,44 veces), lo que indica que la infección por el VNNV podría estar también implicada en la inducción de este gen como se ha descrito en otros estudios (Lama y col., 2020; Liu y col., 2016b). De acuerdo con los resultados descritos en células CIK de riñón de la carpa china (*Ctenopharyngodon idellus*) infectadas con el reovirus de la carpa de hierba (*Grass Carp Reovirus Virus*; GCRV), la sobreexpresión del gen *hsp*70 podría deberse a la activación de su promotor (Li y col., 2020). Aunque los lenguados mostraron un comportamiento aparentemente estresado durante todo el experimento de cohabitación, los peces muertos analizados en las fases de mortalidad aguda y tardía mostraron niveles de transcripción del gen *hsp*70 significativamente menores. Estos resultados parecen indicar que la respuesta al estrés en el lenguado, medida en base a la expresión de este gen biomarcador, podría ser modulada en condiciones de estrés crónico, tras un aumento severo al inicio del episodio estresante, tal y como ocurre en la trucha arcoíris o la tilapia (Basu y col., 2001; Iwama y col., 2004).

Los niveles de expresión del gen *hsp*70 en las doradas de nuestro trabajo no aumentaron significativamente tras la cohabitación con el lenguado. Esto podría sugerir que, al tratarse de una especie con un comportamiento natural nervioso y agresivo, la cohabitación con el lenguado no aumentó sus niveles de estrés. En contraposición, Bildik y col. (2019) observaron una sobreexpresión del gen *hsp*70 en doradas sometidas a estrés térmico. Por lo tanto, otros factores, además del estrés, deben estar implicados en el aumento de la mortalidad observado en ambos ensayos de cohabitación.

Por otro lado, la cuantificación de carga viral reveló que la replicación del VNNV en los lenguados sanos introducidos como cohabitantes fue significativamente menor que la observada en los lenguados infectados tanto

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

en el ensayo de inmersión como en el de cohabitación. Este fenómeno se podría explicar por la baja carga viral presente en el agua, ya que depende de la liberación por parte de las doradas infectadas. Junto con el anteriormente mencionado aumento de la expresión del gen *hsp*70, estos resultados sugieren que tanto el estrés como la infección por el VNNV podrían afectar al inicio tan temprano de la mortalidad y a los altos porcentajes de mortalidad observados en los lenguados cohabitantes sanos. El incremento en la mortalidad o la mortalidad inespecífica son algunas de las consecuencias provocadas por el estrés (Sopinka y col., 2016; Tort, 2011).

La infección en las doradas podría haber ocurrido no solo a través de la columna de agua o el contacto con los lenguados infectados, como se observó en jurel dentón o en lenguado (Nguyen y col., 1997; Souto y col., 2018a), sino también mediante la ingesta de tejido nervioso de los peces muertos. Las doradas presentan un comportamiento caníbal descrito por Castric y col. (2001), que en este estudio fue especialmente evidente hacia los tejidos blandos de los congéneres muertos, que presentaban el cráneo y la cavidad ocular casi vacíos. Sin embargo, los lenguados muertos, mostraban el cerebro parcialmente comido probablemente porque la morfología de su cabeza no permitió el acceso de las doradas a toda la cavidad cerebral. Por tanto, la baja cantidad de muestra de cerebro disponible podría haber dado lugar a una infraestimación de la carga viral en las doradas. Otra posible explicación podría ser que la replicación del VNNV es más eficiente durante los estados larvarios que en los juveniles, de acuerdo con los datos de Toffan y col. (2021). Por último, la baja cuantificación del VNNV podría deberse a la fuerte respuesta inmune observada durante las primeras etapas de la infección viral en adultos de dorada, que produce una rápida neutralización de las partículas virales, aunque no ha sido probado en juveniles (Chaves-Pozo y col., 2012).

Para finalizar, en este capítulo se ha demostrado que las cepas de VNNV aisladas de dorada y de lenguado pueden infectar a ambas especies de peces causando niveles muy similares de mortalidad y se ha constatado la transmisión interespecífica, lo que puede representar una amenaza para la implementación de técnicas como el policultivo.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

CAPÍTULO VI. VIABILIDAD DEL VNNV EN AGUA DE MAR: MODULACIÓN POR LA TEMPERATURA Y SALINIDAD

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

CAPÍTULO VI. VIABILIDAD DEL VNNV EN AGUA DE MAR: MODULACIÓN POR LA TEMPERATURA Y SALINIDAD

6.1. Introducción

La distribución de los genotipos de VNNV a lo largo del globo terráqueo se produce en función de su tolerancia a los rangos de temperatura. Sin embargo, la temperatura es uno de los parámetros que más afecta a la supervivencia viral, especialmente en los virus envueltos como los rhabdovirus IHNV (virus de la necrosis hematopoyética infecciosa) y VHSV (virus de la septicemia hemorrágica viral), en los que se produce una disminución de viabilidad del 99 % en un intervalo de tiempo inferior a dos semanas en agua de mar, a temperaturas superiores a 15 ºC y 4 ºC, respectivamente (Oidtmann y col., 2018). Además, el VHSV presenta una estabilidad mucho menor en agua de mar que en agua dulce y también a temperaturas bajas independientemente del tipo de matriz (Hawley y Garver, 2008). Por el contrario, los virus no envueltos parecen sufrir menos ante el aumento de temperatura, como el IPNV (virus de la necrosis pancreática infecciosa), considerado uno de los virus acuáticos más estables, que muestra una pérdida de viabilidad menor al 1 % tras 150 días a 4 ºC (Oidtmann y col., 2018).

Sin embargo, todavía no se han hecho estudios sobre la viabilidad del VNNV en el medio marino. Su estabilidad puede verse afectada por variables intrínsecas del virus como la cepa o el genotipo, y las variables de la matriz, como el tipo de agua (dulce o salada) y los tratamientos (filtración, autoclave), la presencia de sólidos y/o microbiota, el pH, la dureza del agua, la salinidad, la incidencia de luz solar o la temperatura (Oidtmann y col., 2018). Algunos de estos parámetros, como la temperatura, la concentración de oxígeno

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

disuelto o la salinidad se ven afectados por el incremento en la temperatura global de mares y océanos, derivado del cambio climático.

Por lo tanto, el objetivo de este capítulo es evaluar la viabilidad en agua de mar de tres cepas de VNNV pertenecientes a los genotipos detectados en el sur de Europa, considerando diferentes condiciones experimentales, resumidas en la **Tabla VI.1**, incluyendo la temperatura y la salinidad. Además, con fines comparativos, también se determinará la viabilidad en medio de cultivo celular.

Tabla VI.1. Principales parámetros descritos en la literatura que afectan a la viabilidad del VNNV en agua de mar.

Virus	Condiciones experimentales
Cepa[a]	Matriz
Genotipo[b]	Agua de mar: Artificial / Natural[a]
	Tratamiento:
	Filtrada[b]
	Autoclavada
	Salinidad[a]
	Microbiota[b]
	Sistema
	Abierto – cerrado[b]
	UV –exposición luz solar[b]
	Temperatura[b]
	Tiempo de incubación[b]

[a] Previamente estudiados y también evaluados en este estudio.
[b] Evaluados en este trabajo por primera vez.

6.2. Material y métodos

6.2.1. Cepas virales y propagación

En este capítulo se utilizaron 3 cepas: SpDl-IAusc965.08 (genotipo RGNNV), SJNag93 (SJNNV) y el recombinante Ss160.03 (descrito en el capítulo I). Estas cepas se propagaron en E-11, siguiendo los pasos descritos en el apartado 1.2.5.

6.2.2. Tratamientos del agua y ensayos de incubación

La viabilidad del VNNV se evaluó en agua de mar tanto en condiciones de laboratorio como de acuario, y se comparó con la supervivencia en medio

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

de cultivo L-15. Los distintos ensayos de supervivencia realizados se describen detalladamente a continuación:

- Viabilidad en agua de mar en condiciones de laboratorio. El agua de mar se recogió de la costa atlántica de Galicia (baja salinidad; LS "low salinity": 33 ± 0,2 g/l) y del mar Mediterráneo (alta salinidad; HS "high salinity": 39 ± 0,2 g/l) y se almacenó a 4 ºC hasta su uso. La salinidad se midió con un refractómetro manual (ATAGO). Antes de los ensayos, el agua se filtró por filtros de nitrato de celulosa estériles con un tamaño de poro de 0,2 µm (Fisher Scientific). Cada cepa de VNNV se inoculó por triplicado en botellas de vidrio de 250 ml cerradas y que contenían agua de mar LS. Con fines comparativos, el recombinante Ss160.03 se inoculó también en agua de mar HS.

- Viabilidad en agua de mar en condiciones de acuario. La cepa Ss160.03 se incubó en agua de mar LS en 3 tanques opacos de 50 l y abiertos en el acuario de la Universidad de Santiago de Compostela. Las incubaciones se realizaron con aireación para simular las condiciones de los ensayos *in vivo*.

- Viabilidad en medio de cultivo (L-15). Las tres cepas de VNNV se inocularon por triplicado en botellas de 250 ml cerradas que contenían medio de cultivo L-15.

La concentración viral al inicio de todos los ensayos fue de 10^6 $TCID_{50}$/ml. Las incubaciones se realizaron a 15, 20, 25 y 30 ± 1ºC, en oscuridad, excepto las realizadas en condiciones de acuario, en las que la temperatura se fijó en 25 ºC y con el fotoperiodo establecido en las instalaciones (12:12).

En cuanto a los muestreos, se recogieron alícuotas de 5 ml al inicio de la incubación (1 hpi / 0 dpi), en cada uno de los ensayos. Las muestras del experimento del acuario se recogieron diariamente hasta los 7 dpi, mientras que en los ensayos de viabilidad en agua de mar en condiciones de laboratorio y en medio de cultivo celular, los muestreos se realizaron semanalmente hasta los 119 y 140 dpi, respectivamente. Tras la toma de muestras no se añadió agua de mar ni medio de cultivo adicional a los recipientes de la incubación. Las muestras de agua de mar se filtraron por 0,2 µm antes de cuantificar la carga viral.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

6.2.3. Cuantificación de carga viral: TCID50 y copias de ARN1/ml

La cuantificación de carga viral se realizó mediante titulación y RT-qPCR, siguiendo el proceso descrito en los apartados 2.2.1 y 1.2.4, respectivamente, a partir de todas las muestras recogidas en cada ensayo.

6.2.4. Aislamiento bacteriano y caracterización

Se evaluó el posible crecimiento bacteriano en las incubaciones de agua de mar en condiciones de laboratorio a 25 y 30 ºC, ya que mostraron cierta turbidez, a pesar de que el agua se filtró de forma previa a la adición del inóculo viral. Para ello, se sembraron 100 µl de las muestras de agua de mar procedentes de las incubaciones a 25 y 30 ºC en agar marino (AM), medio *Flexibacter maritimus* (FMM) y TCBS, y se incubaron a 25 ºC. Tras 48 h, se seleccionaron las colonias y se sembraron en estría para aislar los cultivos puros, de los cuales se extrajo el ADN genómico utilizando un kit Nucleospin Tissue ® (Macherey-Nagel) siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante. El ADN se sometió a PCR convencional utilizando los cebadores del gen 16S F/R (5′-AGAGTTTGATCGCTCAG-3′ / 5′-GGTTACCTTGTTACGACTTT-3′; Lane, 1991), de acuerdo con el siguiente perfil térmico: 94 ºC, 2 min; 35 x (94 °C, 1 min; 56 °C, 1 min; 72 °C, 1 min) y 72 °C, 5 min. Los productos de PCR se secuenciaron y se determinó la similitud con otras cepas mediante la herramienta BLASTn, en la base de datos GenBank.

6.2.5. Análisis estadístico

Las curvas de decaimiento de carga viral se analizaron utilizando los estadísticos descritos en el apartado 1.2.9.

6.3. Resultados

6.3.1. Viabilidad en agua de mar de baja salinidad (LS)

La mayor supervivencia de las tres cepas se registró a 15 ºC (**Fig. VI.1**). El recombinante RG/SJ se mantuvo viable hasta el día 112 pi, mientras que la cepa SJNNV mostró una supervivencia inferior, de en torno a los 90 días; la cepa RG fue la que mostró el valor más bajo (algo más de 60 días). La tendencia de la curva de decaimiento de la cepa RG con respecto a la SJ y el

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

recombinante mostró diferencias significativas (p valor = 0,02), mientras que el comportamiento de las cepas con cápside SJ (RG/SJ y SJNNV) fue similar (p > 0,05), con una reducción progresiva del número de partículas viables con el paso del tiempo. El título de estas cepas disminuyó hasta el 50% del valor inicial (alrededor de 10^3 $TCID_{50}$) en el día 63. Además, aunque no se recuperaron partículas infectivas del SJNNV más allá del día 91, el recombinante siguió viable hasta el día 112 pi (2,9 x 10^1 $TCID_{50}$/ml). Por el contrario, el título inicial de la cepa RGNNV se mantuvo sin oscilaciones significativas hasta el día 49 pi. Después de 56 dpi, se observó una reducción de alrededor de 1,5 log y a continuación, la carga viral en el agua decayó de forma abrupta hasta 10^3 $TCID_{50}$/ml en el día 63 pi. A partir de ese momento, no se detectaron partículas infectivas de RGNNV.

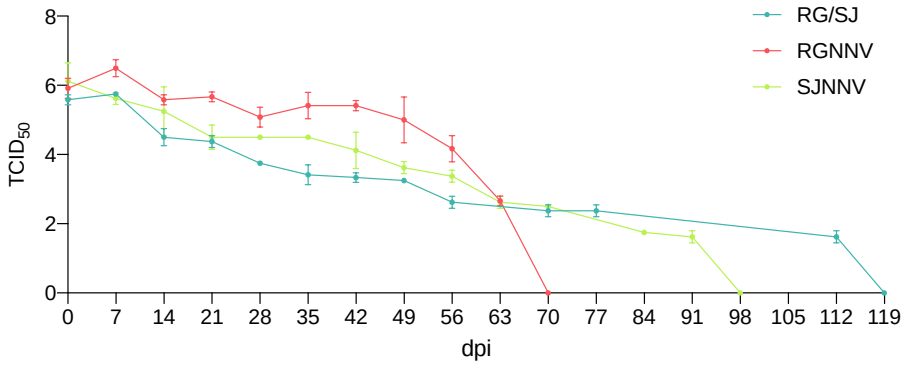


Figura VI.1. Curva de decaimiento a 15 ºC en agua de mar de baja salinidad (LS), de la cepa RG/SJ (azul), RGNNV (rojo) y SJNNV (verde). Los datos representan el promedio del $TCID_{50}$ de las 3 réplicas ± SD.

A 20 ºC (**Fig. VI.2**), la supervivencia de las cepas RGNNV y RG/SJ siguió una tendencia similar (p > 0,05) manteniendo el título inicial con un ligero descenso (RG/SJ: 3 x 10^4 y RGNNV: 2 x 10^4 $TCID_{50}$) hasta los días 35 y 42 pi, respectivamente. Sin embargo, la pérdida de viabilidad se produjo 14 días antes en el recombinante. La cepa SJNNV sufrió una fuerte reducción en el título de 2 log hasta el día 21 pi y no se detectaron partículas infectivas en el día 49 pi.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

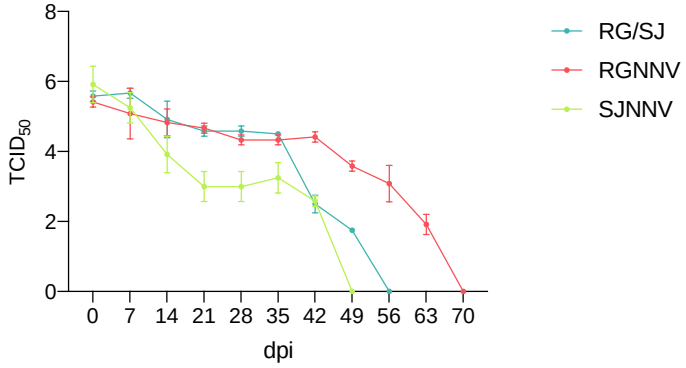


Figura VI.2. Curva de decaimiento a 20 ºC en agua de mar de baja salinidad (LS), de la cepa RG/SJ (azul), RGNNV (rojo) y SJNNV (verde). Los datos representan el promedio del TCID50 de las 3 réplicas ± SD.

La viabilidad del VNNV a 25 ºC (**Fig. VI.3**) fue entre 1 y 2 semanas menor, dependiendo de la cepa, en comparación con la incubación a 20 ºC. El título de la cepa RGNNV se mantuvo estable en valores altos (10^6 - 3 x 10^5 $TCID_{50}$/ml) durante tres semanas y luego mostró una fuerte reducción de alrededor de 3 log en el día 28 pi. Este decaimiento fue más rápido en la cepa SJNNV y, a los 35 dpi, el título de ambas cayó por debajo de niveles detectables. El número de partículas viables del recombinante RG/SJ fue disminuyendo progresivamente, hasta que finalmente se redujo a la mitad en el día 21 pi y no se detectaron partículas viables a los 28 dpi.

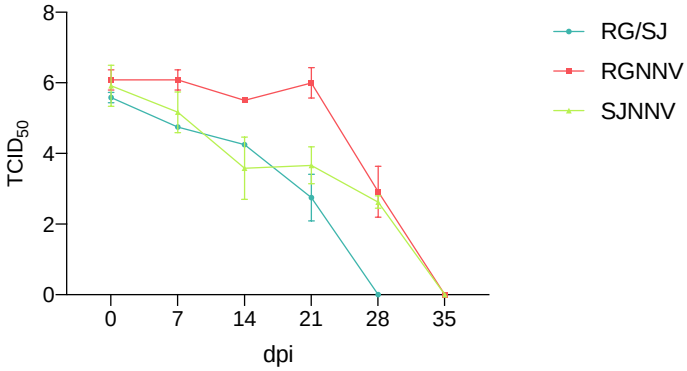


Figura VI.3. Curva de decaimiento a 25 ºC en agua de mar de baja salinidad (LS), de la cepa RG/SJ (azul), RGNNV (rojo) y SJNNV (verde). Los datos representan el promedio del TCID50 de las 3 réplicas ± SD.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

A 30 ºC, la viabilidad de las cepas RGNNV y SJNNV se redujo en solo 3 semanas a valores próximos a 10^2 $TCID_{50}$ (**Fig. VI.4**), y el recombinante RG/SJ sólo sobrevivió durante 7 días (2 x 10^4 $TCID_{50}$/ml).

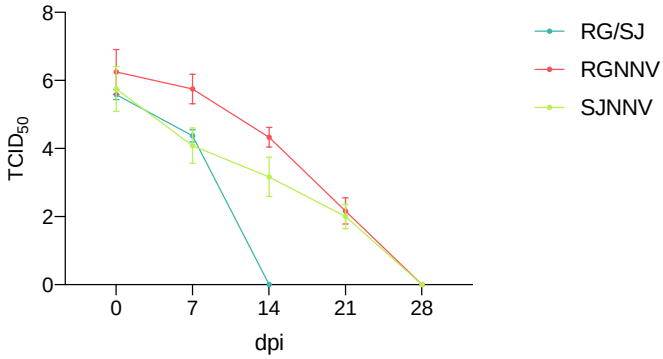


Figura VI.4. Curva de decaimiento a 30 ºC en agua de mar de baja salinidad (LS), de la cepa RG/SJ (azul), RGNNV (rojo) y SJNNV (verde). Los datos representan el promedio del TCID50 de las 3 réplicas ± SD.

6.3.2. Viabilidad de la cepa recombinante en agua de mar de alta salinidad (HS)

Con fines comparativos, el recombinante también se inoculó en agua de mar HS. En estas condiciones, la supervivencia se redujo de forma significativa (p 0,02) en la incubación a 15 ºC con respecto al agua de mar LS (112 dpi), ya que no se detectaron partículas viables más allá de los 49 dpi. A 20 y 25 ºC, la supervivencia fue similar para ambas salinidades (49 y 21 dpi, respectivamente) aunque la curva de decaimiento mostró pequeñas diferencias.

En detalle (**Fig. VI.5**), la viabilidad a 15 ºC se mantuvo estable durante cuatro semanas (7 x 10^4 $TCID_{50}$/ml) y, a continuación, sufrió una disminución progresiva de más de un logaritmo (10^3) en el día 42 pi. Finalmente, no se detectaron partículas infectivas más allá del día 49 pi.

A 20 ºC, la viabilidad viral decayó progresivamente hasta el día 35 pi; en el día 49 pi, el título se situó en torno a 10^2 $TCID_{50}$ y no se detectaron partículas virales en los puntos de muestreo posteriores. La carga viral en la incubación a 25 ºC siguió la misma tendencia que a 15 ºC y 20 ºC, con una disminución de ~2 log hasta el día 21 pi, y, coincidiendo con los resultados de

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

la incubación en LS, no se detectaron partículas virales posteriormente. A 30 ºC se obtuvo la inactivación completa del recombinante en menos de una semana. Por lo tanto, para establecer mejor el periodo de viabilidad, se repitió este ensayo realizando muestreos diarios. Los resultados indicaron que sólo se recuperaron partículas viables hasta las 48 hpi (24 hpi: 2 x 10^5; 48 hpi: 10^2 $TCID_{50}$/ml).

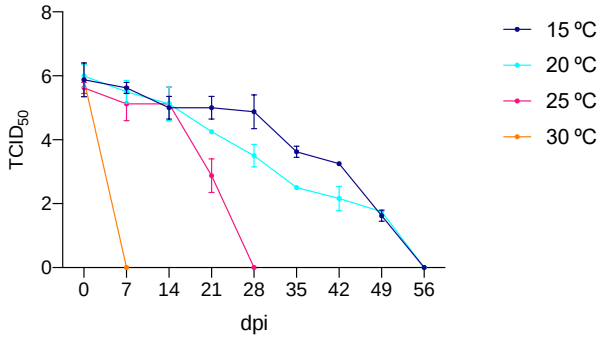


Figura VI.5. Tendencia de la cepa RG/SJ en la incubación en agua de mar de alta salinidad (HS) a 15 ºC (azul oscuro), 20 ºC (azul claro), 25 ºC (rosa) y 30 ºC (naranja). Las curvas representan el promedio ± SD de las 3 réplicas.

6.3.3. Viabilidad en condiciones de acuario

El ensayo de viabilidad de la cepa RG/SJ a 25 ºC en condiciones de acuario permitió detectar una alta carga viral tras una hora de incubación (7,81 x 10^5 $TCID_{50}$), que disminuyó a las 48 y 72 hpi hasta valores de 2 x 10^3 y 3 x 10^1 $TCID_{50}$, respectivamente. La inactivación completa del VNNV se alcanzó en el día 4 pi.

6.3.4. Viabilidad en medio de cultivo L-15

La incubación en medio de cultivo L-15 detectó los valores más altos de viabilidad en las tres cepas a 15 ºC (**Fig. VI.6**).

El título de las cepas con ARN1 tipo RG (RG/SJ y RGNNV) se mantuvo en torno a 3 x 10^4 y 2 x 10^4 $TCID_{50}$/ml, respectivamente, hasta el día 140 pi, aunque con ligeras diferencias no significativas entre ellas. Así, el recombinante perdió un log a los 49 dpi, mientras que esa reducción ocurrió en la cepa RGNNV entre 3/4 semanas antes (21-28 dpi). La viabilidad de ambas cepas se mantuvo en estos valores en el día 140, en el cual se finalizó

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

el experimento. En cuanto a la cepa SJNNV, aunque el título no se redujo en las primeras 4 semanas, en el día 35 pi disminuyó alrededor de 1,5 log. La carga viral se dividió a la mitad en el día 84 pi y no se detectó virus viable a los 98 dpi.

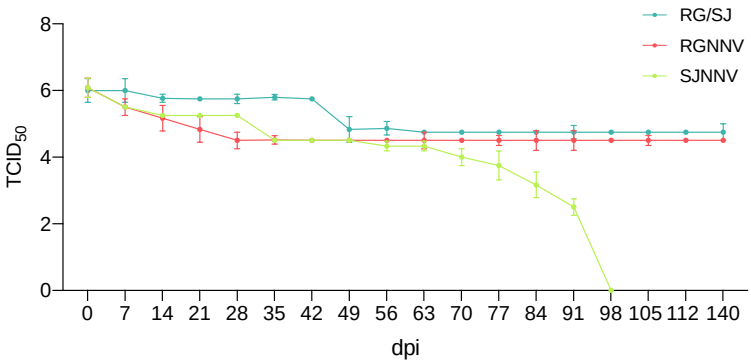


Figura VI.6. Curva de decaimiento a 15 ºC en medio de cultivo L-15, de las cepas RG/SJ (azul), RGNNV (rojo) y SJNNV (verde). Los datos representan el promedio del $TCID_{50}$ de las 3 réplicas ± SD.

A 20 ºC (**Fig. VI.7**), el recombinante RG/SJ mostró los valores más altos de supervivencia (p 0,04), ya que se mantuvo viable hasta los 105 dpi, con un título de 3 x 10^2 $TCID_{50}$/ml.

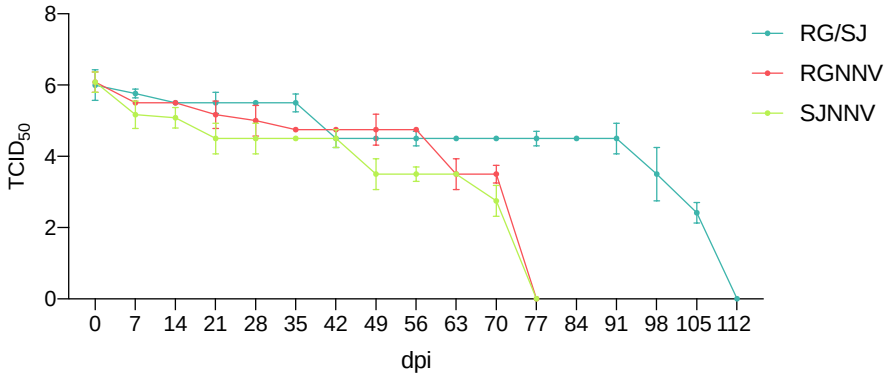


Figura VI.7. Curva de decaimiento a 20 ºC en medio de cultivo L-15, de las cepas RG/SJ (azul), RGNNV (rojo) y SJNNV (verde). Los datos representan el promedio del $TCID_{50}$ de las 3 réplicas ± SD.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Por otra parte, tanto las cepas RGNNV como SJNNV se recuperaron en cultivo celular hasta el día 70 pi, con un título de 3 x 10^3 y 5 x 10^2 $TCID_{50}$/ml, respectivamente. Al inicio, ambas mantuvieron valores de $TCID_{50}$ similares, pero sufrieron un fuerte descenso en los días 42 y 63 pi, respectivamente. En cuanto al recombinante RG/SJ, a pesar de mostrar un ligero decaimiento en la viabilidad hasta el día 35 pi, la carga viral se mantuvo constante desde el día 42 al 91 pi. En el día 105 pi se redujo a la mitad, y una semana después (112 dpi) ya no se detectaron partículas viables.

A 25 ºC se observó un claro descenso de la viabilidad de las tres cepas, aunque al igual que ocurrió a 20 ºC, la mayor supervivencia la mostró la cepa RG/SJ, que se mantuvo viable hasta el día 49 pi. En cuanto a las cepas RGNNV y SJNNV, sufrieron un descenso progresivo en la supervivencia hasta los días 28 y 35 pi, respectivamente (**Fig. VI.8**).

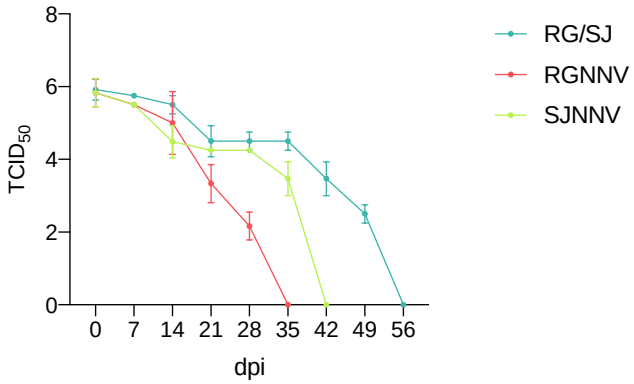


Figura VI.8. Curva de decaimiento a 25 ºC en medio de cultivo L-15, de las cepas RG/SJ (azul), RGNNV (rojo) y SJNNV (verde). Los datos representan el promedio del $TCID_{50}$ de las 3 réplicas ± SD.

Finalmente, las cepas con cápside tipo SJ (RG/SJ y SJNNV) sufrieron una llamativa reducción de la viabilidad en la incubación a 30 ºC (**Fig. V.9**) en los días 28 y 14 pi, con valores promedio de título de 2 x 10^2 y 5 x 10^3 $TCID_{50}$/ml, respectivamente. Por otra parte, la cepa RGNNV mostró una curva de decaimiento similar a la de 25 ºC.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

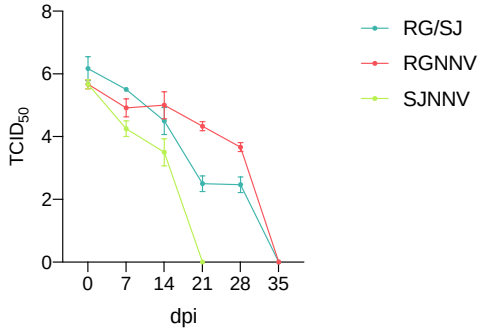


Figura VI.9. Curva de decaimiento a 30 ºC en medio de cultivo L-15, de las cepas RG/SJ (azul), RGNNV (rojo) y SJNNV (verde). Los datos representan el promedio del TCID50 de las 3 réplicas ± SD.

6.3.5. Cuantificación del número de copias genómicas

La carga viral promedio detectada tras 1 hpi fue de 3 x 10^8 copias de ARN1/ml y no se observó una reducción significativa, incluso cuando los resultados de $TCID_{50}$ reflejaron la inactivación total del virus (**Tabla VI.2**).

Tabla VI.2. Carga viral (número de copias de ARN1 viral/ml) de las 3 cepas de VNNV cuantificadas al inicio del experimento (a) y cuando las partículas virales ya estaban inactivadas (b). Los valores representan el promedio de tres réplicas.

	RGNNV/SJNNV	RGNNV	SJNNV
Número de copias del VNNV en la incubación en agua de mar LS			
15 ºC	2.7 x 10^8 (a) - 6.9 x 10^7 (b)	7.3 x 10^7 - 8.8 x 10^7	5.3 x 10^8 - 7.6 x 10^8
20 ºC	9.6 x 10^7 - 1.7 x 10^8	4.4 x 10^8 - 4.7 x 10^8	7.6 x 10^7 - 1.0 x 10^8
25 ºC	9.8 x 10^7 - 2.5 x 10^8	9.6 x 10^7 - 9.7 x 10^7	3.6 x 10^8 - 1.9 x 10^8
30 ºC	3.6 x 10^8 - 9.7 x 10^7	8.4 x 10^7 - 6.7 x 10^7	3.3 x 10^8 - 7.9 x 10^7
Número de copias del VNNV en la incubación en agua de mar HS			
15 ºC	4.2 x 10^8 - 1.1 x 10^8	-	-
20 ºC	5.6 x 10^8 - 9.7 x 10^7	-	-
25 ºC	4.3 x 10^8 - 3.7 x 10^8	-	-
30 ºC	7.8 x 10^7 - 8.2 x 10^7	-	-

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

	RGNNV/SJNNV	RGNNV	SJNNV
Número de copias del VNNV en la incubación en medio de cultivo L-15			
15 ºC	3.9×10^8 - 3.3×10^8	8.9×10^7 - 9.0×10^7	3.9×10^8 - 3.0×10^8
20 ºC	4.6×10^8 - 2.9×10^8	3.1×10^8 - 3.3×10^8	3.3×10^8 - 1.6×10^8
25 ºC	3.3×10^8 - 7.9×10^7	4.6×10^8 - 8.7×10^7	1.9×10^8 - 6.3×10^7
30 ºC	9.2×10^7 - 1.2×10^8	1.9×10^8 - 6.7×10^7	1.1×10^8 - 7.7×10^7

6.3.6. Aislamiento de colonias bacterianas y caracterización

La siembra en los medios de cultivo para bacterias marinas de las incubaciones a 25 y 30 ºC sólo mostró crecimiento bacteriano en el medio AM. La secuenciación del gen 16S permitió identificar todos los aislados, que mostraron una similitud del 100% con los géneros *Idiomarina*, *Marinobacter*, *Morganella*, *Limnobacter* y *Salengentibacter*.

6.4. Discusión

La vía de transmisión más importante de los virus acuáticos es la diseminación a través de la columna de agua. Sin embargo, la dinámica de las poblaciones virales está afectada por factores como la temperatura, la composición fisicoquímica del agua y/o la carga biológica, entre otros (Oidtmann y col., 2018).

La replicación del VNNV es un proceso sensible a la temperatura y está regulado principalmente por la molécula de ARN1 (Hata y col., 2010; Panzarin y col. 2014; Souto y col., 2019). Las temperaturas óptimas para el crecimiento *in vitro* de los genotipos encontrados en el sur de Europa oscilan entre los 20 y 30 ºC, y parecen correlacionarse con el inicio de los brotes epizoóticos (Iwamoto y col., 2000; Panzarin y col., 2014). Curiosamente, las tres cepas analizadas en este capítulo mostraron la mayor viabilidad en agua de mar a 15 ºC (RGNNV: 63 dpi, SJNNV: 91 dpi, RG/SJ: 112 dpi) y su supervivencia se redujo a medida que aumentó la temperatura. Estos datos de supervivencia sugieren un alto potencial de diseminación de las partículas infecciosas a través del medio acuático durante largos periodos, antes de que el aumento estival de las temperaturas favorezca la aparición de brotes de ERV.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

A 20 ºC, las cepas con cápside SJ (RG/SJ y SJNNV) sufrieron una reducción considerable en la viabilidad, mientras que la RGNNV mostró un patrón de inactivación similar al observado a 15 ºC. A 25 y 30 ºC se observó una rápida pérdida de viabilidad de las tres cepas. A 30 ºC, aunque la RGNNV y SJNNV persistieron durante unos 21 días, la caída de en la cantidad de virus viable se produjo antes en esta última (RG: 5×10^5 - 2×10^4 y SJ: 10^4 - 2×10^3, a los 7 y 14 dpi, respectivamente). La elevada supervivencia de la cepa RGNNV con respecto a las demás, puede suponer una ventaja para su diseminación en el medio marino y explicaría que cepas de este genotipo estén detrás de la mayoría de los brotes de ERV en todo el mundo (~90 %), y especialmente en el sur de Europa, durante los períodos de temperaturas cálidas (Bandín y Souto, 2020).

En general, se observó una correlación inversa entre la persistencia del VNNV y el aumento de la temperatura del agua, aunque solo fue evidente por encima de los 20 ºC para la cepa RGNNV. La pérdida de viabilidad a altas temperaturas es una característica comúnmente observada en muchos virus acuáticos (Oidtmann y col., 2018), excepto para el LCDV, en el que la supervivencia a 22 ºC fue mayor que a 18 ºC (Leiva-Rebollo y col., 2020).

La supervivencia del VNNV también puede estar comprometida por la presencia de microbiota en la matriz de agua, especialmente de poblaciones bacterianas con actividad antiviral (Kamei y col., 1988; Shimizu y col., 2006; Teng y col., 2020; Yoshimizu y col., 1986). Los experimentos realizados en este trabajo no se suplementaron con antibióticos para evitar introducir nuevas variables en las incubaciones, por lo que el agua de mar se filtró por 0,2 µm antes de la incorporación del inóculo viral para prevenir la contaminación por microorganismos. Sin embargo, las incubaciones realizadas a 25 y 30 ºC mostraron cierto crecimiento bacteriano, permitiendo la identificación de 5 géneros. En ninguno de ellos se describió actividad antiviral, aunque sí se ha visto que otras bacterias marinas de los géneros *Vibrio*, *Aeromonas*, *Achromobacter* y *Pseudomonas* muestran actividad virucida o inhibitoria contra diferentes virus, como el IHNV, el IPNV y el KHV (Garver y col., 2013; Kamei y col., 1988; Oidtmann y col., 2018; Shimizu y col., 2006; Toranzo y col., 1983). Por lo tanto, se necesitan más estudios para determinar

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

si el crecimiento bacteriano fue responsable de la disminución de la viabilidad del VNNV en este trabajo.

Por otra parte, la salinidad del agua de mar también es un parámetro importante que afecta de forma negativa a la supervivencia de los virus (Pinon y Vialette, 2019). Algunos estudios mostraron una correlación entre la inactivación del IHNV y el IPNV a 15 ºC con el aumento de la salinidad del agua (Barja y col., 1983), por lo que también se evaluó la supervivencia del recombinante en agua de mar con alta salinidad (HS). A 15 ºC, la inactivación del VNNV se aceleró con respecto a la incubación a baja salinidad (112 dpi), ya que ocurrió alrededor del día 49, sugiriendo que su dispersión en aguas de salinidad más alta podría estar comprometida en los períodos en los que la temperatura del agua rondase los 15 ºC. Estos resultados contrastan con las observaciones de Frerichs y col. (2000), que detectaron partículas virales infectivas tras una incubación de 6 meses en agua de mar artificial con salinidad 37 g/l. Las diferencias en la matriz podrían explicar la discrepancia en la viabilidad del VNNV, ya que las partículas virales tienden a agregarse a la materia en suspensión presente en el medio, dando lugar a una reducción en el número de partículas viables (Oidtmann y col., 2018). A 30 ºC, la inactivación del VNNV se produjo durante los 2 primeros días mientras que, en agua con baja salinidad, la supervivencia fue superior a 7 días. La reducción del título en el grupo HS podría deberse a la agregación de las partículas virales inducida por las sales (Gye y Nishizawa, 2016), pero se desconoce la razón por la que este efecto solo ocurre a 15 y 30 ºC. Sin embargo, no se observaron diferencias en la viabilidad del VNNV con respecto al agua de baja salinidad en el rango de temperaturas en que se reportan la mayoría de los brotes de VNNV en la naturaleza, en torno a 20 – 25 ºC.

También se evaluó la supervivencia del VNNV en las instalaciones del acuario, ya que se aproximan más a las condiciones en una planta de acuicultura. A diferencia de los ensayos de laboratorio, que se llevaron a cabo en botellas cerradas, las incubaciones en el acuario se realizaron en tanques descubiertos con aireadores, lo que permitió que el contenido estuviera expuesto a la luz y al oxígeno, dos factores que contribuyen a la inactivación viral (Oidtmann y col., 2018; Rule y col, 2010). La supervivencia de la cepa

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

RGNNV/SJNNV a 25 ºC en los ensayos de laboratorio fue de en torno a un mes, mientras que, en los tanques del acuario la inactivación se produjo en 4 días. Por lo tanto, nuestros resultados confirman que tanto la luz como la exposición al oxígeno tienen un impacto negativo en la estabilidad del virus, aunque la contribución de cada uno de ellos y los mecanismos implicados en la pérdida de viabilidad todavía no se han podido definir. También se puede decir que, en ausencia de peces infectados o individuos susceptibles, la persistencia del VNNV en las instalaciones del acuario es muy limitada.

Por otra parte, este estudio también demuestra una mayor supervivencia del VNNV en el medio de cultivo celular que en el agua de mar. Esto puede deberse a que la composición del medio L-15, principalmente sales inorgánicas, aminoácidos y vitaminas disueltas en agua de elevada pureza, previene la agregación de las partículas virales. Tampoco contiene enzimas proteolíticas que sí pueden estar presentes en el agua de mar, y que, como su nombre indica, afectan a la integridad de las proteínas de la cápside (Jarungsriapisit y col., 2020). Además, la supervivencia del VNNV en agua desionizada es superior a la del agua sin tratar porque se minimiza la agregación de las partículas virales (Gye y Nishizawa, 2016, 2019). Estos autores también sugieren que el suero fetal bovino utilizado para el cultivo de células en las que se propaga el VNNV, podría aumentar la supervivencia viral mediante la interacción y estabilización con las protuberancias de la cápside. Aunque en nuestro estudio se evaluó la supervivencia del VNNV en medio de cultivo L-15 sin suero, los resultados muestran una mayor supervivencia que en agua de mar. Los datos de viabilidad observados a 25 ºC coinciden con un estudio anterior, en el que se describe la inactivación completa del VNNV en un período de 1-3 meses en la incubación con medio de cultivo celular (Frerichs y col., 2000). Estos autores también observaron que el título de VNNV se mantenía estable durante un año a 15 ºC en medio de cultivo celular. A pesar de que nuestros experimentos terminaron en el día 140 pi (unos 4 meses y medio), la viabilidad de las cepas RGNNV y del recombinante RG/SJ a 15 ºC apenas mostró reducción, lo que parece indicar una gran persistencia viral, posiblemente similar a la descrita por Frerichs y col. (2000). Sin embargo, por alguna razón que desconocemos, la inactivación de SJ se aceleró repentinamente alrededor de los tres meses.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Por último, la pérdida de viabilidad observada en casi todas las incubaciones experimentales discutidas anteriormente no se correlacionó con una reducción del número de copias de ARN1, incluso en el momento en el que se alcanzó la inactivación completa del VNNV. Esto sugiere que el genoma del virus se mantuvo intacto en el interior de cada virión, previniendo la acción de las ARNasas presentes de forma natural en el agua de mar (Tsai y col., 1995).

Por tanto, los resultados obtenidos en este capítulo permiten concluir que el VNNV muestra los valores más elevados de viabilidad en agua de mar a 15 ºC, destacando así el gran potencial de propagación en la columna de agua durante largos periodos de tiempo. Sin embargo, la supervivencia se reduce de forma drástica en aguas con una elevada concentración de sales. Además, los resultados obtenidos en condiciones de acuario sugieren que la luz solar y el oxígeno disuelto podrían reducir la persistencia del VNNV. De forma general, estos resultados contribuyen al conocimiento sobre los brotes de VNNV en la naturaleza, que pueden estar relacionados con los cambios en la temperatura del agua y/o la salinidad como consecuencia del cambio climático. En base a estos datos de viabilidad, también se pueden desarrollar estrategias de prevención para aplicar en la industria de la acuicultura.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

CONCLUSIONES

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en esta tesis doctoral contribuyen al conocimiento sobre la epidemiología del VNNV y los factores desencadenantes de los brotes de ERV en la en las piscifactorías, así como de los mecanismos que puedan utilizarse para su control, tal y como se indica a continuación.

1. Los genotipos de betanodavirus SJNNV y RGNNV/SJNNV están presentes en un gran número de especies de peces capturadas en la costa atlántica gallega (8/16). Los aislados recombinantes obtenidos de sardina y caballa poseen cambios en la secuencia aminoacídica de la polimerasa y la proteína capsidal con respecto a las cepas parentales y a otros recombinantes aislados de dorada y lenguado. Será necesario aclarar la implicación de estos cambios en la tolerancia a la temperatura, la virulencia y la interacción con el huésped.

2. Los invertebrados *Brachionus plicatilis* y *Artemia salina* utilizados como alimento vivo de las larvas de peces marinos pueden actuar como vectores mecánicos del VNNV. La ingesta de invertebrados portadores del virus por parte de los peces desencadena la enfermedad y causa una mortalidad a niveles similares a la infección experimental por baño, aunque se retrasa en el tiempo.

3. Las microalgas *Isochrysis galbana* y *Nannochloropsis gaditana*, comúnmente utilizadas en instalaciones de acuicultura para el enriquecimiento del zooplancton, producen y liberan al medio acuático alguna/s sustancia/s con propiedades antivirales. Esta apreciación abre un nuevo campo de investigación acerca de las ventajas del cultivo de peces utilizando la técnica del agua verde.

4. Las altas densidades de cultivo en peces infectados con VNNV dan lugar a un inicio más temprano de la mortalidad, favorecen la

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

replicación viral y reducen las posibilidades de que el pez sobreviva a la infección. La carga viral en el agua de cultivo se correlaciona de forma positiva con la aparición de signos clínicos y los picos de mortalidad en lenguado. Estos resultados ponen de manifiesto el riesgo que suponen las altas densidades de población para la aparición de episodios de ERV en las plantas de cría de peces.

5. El VNNV puede transmitirse de forma horizontal entre doradas y lenguados cultivados en cohabitación, lo que supone una seria amenaza para la implementación del policultivo de estas especies en el área mediterránea. Además, la cría en cohabitación de especies que poseen un comportamiento dominante (dorada) y sumiso (lenguado), ha demostrado que el estrés generado en la especie sumisa tiene un gran impacto en el resultado de la infección .
6. El VNNV muestra los valores más elevados de viabilidad en agua de mar a 15 ºC, destacando así el gran potencial de propagación en la columna de agua durante largos periodos de tiempo antes de que se produzca un aumento de la temperatura y la aparición de brotes de enfermedad en los peces. Sin embargo, en aguas con una elevada concentración de sales, la supervivencia se reduce de forma drástica . En condiciones de acuario, que se asemejan a las de una planta de cultivo, y en ausencia de peces infectados que puedan liberar el virus, la persistencia del VNNV sufre una reducción considerable debido, probablemente, al efecto de la luz UV y el oxígeno sobre la viabilidad viral.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

CONCLUSIONS

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

CONCLUSIONS

The results obtained in this doctoral thesis contribute to the knowledge on NNV epidemiology and to the factors that trigger VER outbreaks in fish farms, as well as the mechanisms that can be used for its control, as indicated below.

1. SJNNV and RGNNV/SJNNV betanodavirus genotypes are present in a large number of fish species caught along the Galician Atlantic coast (8/16). Reassortant isolates obtained from pilchard and mackerel carry certain changes in the amino acid sequence of the polymerase and the capsid protein with regard to the parental strains and other reassortants isolated from sea bream and sole. It will be necessary to clarify the effects of these changes on temperature tolerance, virulence and host interaction.

2. Invertebrates *Brachionus plicatilis* and *Artemia salina* used as live food for marine fish larvae may act as NNV mechanical vectors. Ingestion of invertebrates that carry the virus triggers the disease and causes mortality at similar levels as the bath infection, although delayed in time.

3. The microalgae *Isochrysis galbana* and *Nannochloropsis gaditana*, commonly used in aquaculture facilities for zooplankton enrichment, produce and release to the aquatic environment some substance/s with antiviral properties. This assessment opens up a new field of research into the advantages of fish culture using the green water technique.

4. High rearing densities in NNV-infected fish result in an earlier onset of mortality, favor viral replication and reduce the chances of the fish surviving infection. Viral load in rearing water positively correlates with the onset of clinical signs and the mortality peak in sole. This

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

highlights the risk posed by high stocking densities for the occurrence of VER events in fish farms.

5. NNV can be horizontally transmitted between cohabitant gilthead seabream and sole, which poses a serious threat to the implementation of the polyculture of these species in the Mediterranean area. In addition, rearing species with dominant (sea bream) and submissive (sole) behavior by cohabitation has shown that the stress caused in the submissive species has a great impact on the outcome of infection.

6. NNV shows the highest viability values in seawater at 15 ºC, thus highlighting the great potential to spread in the water column for long periods of time before a rise in temperature and the appearance of disease outbreaks in fish. However, in water with a high salt concentration, survival is dramatically reduced. In aquarium conditions, which better resemble those of a fish farm, and in the absence of infected fish that can shed the virus, NNV persistence is greatly reduced, probably due to the effect of UV light and oxygen on viral viability.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Adachi, K., Ichinose, T., Takizawa, N., Watanabe, K., Kitazato, K., & Kobayashi, N. (2007). Inhibition of betanodavirus infection by inhibitors of endosomal acidification. *Archives of Virology*, 152(12), 2217-2224.

Adachi, K., Ichinose, T., Watanabe, K., Kitazato, K., & Kobayashi, N. (2008). Potential for the replication of the betanodavirus redspotted grouper nervous necrosis virus in human cell lines. *Archives of Virology*, 153(1), 15-24.

Ahlquist, P. (2002). RNA-dependent RNA polymerases, viruses, and RNA silencing. *Science*, 296(5571), 1270-1273.

Ahlquist, P., Noueiry, A. O., Lee, W.-M., Kushner, D. B., & Dye, B. T. (2003). Host Factors in Positive-Strand RNA Virus Genome Replication. *Journal of Virology*, 77(15), 8181-8186.

Álvarez-Torres, D., Gómez-Abellán, V., Arizcun, M., García-Rosado, E., Béjar, J., & Sepulcre, M. P. (2018). Identification of an interferon-stimulated gene, *isg*15, involved in host immune defense against viral infections in gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish and Shellfish Immunology*, 73(October 2017), 220-227.

Alves Martins, D., Rocha, F., Castanheira, F., Mendes, A., Pousão-Ferreira, P., Bandarra, N., Coutinho, J., Morais, S., Yúfera, M., Conceiçao, L. E. C., Martínez-Rodríguez, G. (2013). Effects of dietary arachidonic acid on cortisol production and gene expression in stress response in Senegalese sole (*Solea senegalensis*) post-larvae. *Fish Physiology and Biochemistry*, 39(5), 1223–1238.

Arimoto, M., Mori, K., Nakai, T., Muroga, K., & Furusawa, I. (1993). Pathogenicity of the causative agent of viral nervous necrosis disease in striped jack, *Pseudocaranx dentex* (Bloch & Schneider). *Journal of Fish Diseases*, 16(5), 461-469.

Arimoto, M, Mushiake, K., Mizuta, Y., Nakai, T., Muroge, K., & Furusawa, I. (1992). Detection of Striped Jack Nervous Necrosis Virus (SJNNV) by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Fish Pathology*, 27(4), 191-195.

Athanassopoulou, F., Billinis, C., & Prapas, T. (2004). Important disease conditions of newly cultured species in intensive freshwater farms in Greece: First incidence of nodavirus infection in *Acipenser* sp. *Diseases of Aquatic Organisms*, 60(3), 247-252.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R., Moore, D., Seidman, J., Smith, J., & Struhl, K. (1995). *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley and Sons; INC, Ed.). New York, N.Y.

Avila-Villa, L. A., Martínez-Porchas, M., Gollas-Galvan, T., López-Elías, J. A., Mercado, L., Murguia-López, V., Mendoza Cano, F., & Hernandez-López, J. (2011). Evaluation of different microalgae species and Artemia (*Artemia franciscana*) as possible vectors of necrotizing hepatopancreatitis bacteria. *Aquaculture*, 318(3–4), 273–276.

Azad, I. S., Jithendran, K. P., Shekhar, M. S., Thirunavukkarasu, A. R., & de la Pena, L. D. (2006a). Immunolocalisation of nervous necrosis virus indicates vertical transmission in hatchery produced Asian sea bass (*Lates calcarifer* Bloch)-A case study. *Aquaculture*, 255(1-4), 39-47.

Azad, I. S., Shekhar, M. S., Thirunavukkarasu, A. R., & Jithendran, K. P. (2006b). Viral nerve necrosis in hatchery-produced fry of Asian seabass *Lates calcarifer*: Sequential microscopic analysis of histopathology. *Diseases of Aquatic Organisms*, 73(2), 123-130.

Baeck, G. W., Gomez, D. K., Oh, K. S., Kim, J. H., Choresca, C. H., & Park, S. C. (2007). Detection of piscine nodaviruses from apparently healthy wild marine fish in Korea. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 27(3), 116-122.

Bailey, L., Newman, J., & Porterfield, J. (1975). The multiplication of Nodamura Virus in insect and mammalian cell cultures. *Journal of General Virology*, (26), 15-20.

Ball, L. A., Hendry, D. A., Johnson, J. E., Rueckert, R. R. & Scotti, P. D. (2000). tegnoFamily Nodaviridae. In *Virus Taxonomy: Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, pp. 747–755. Edited by M. Regenmorte, C. Fauquet, D. Bishop, E. Carstens, M. Estes, S. Lemon, J. Maniloff, M. Mayo, D. McGeoch, y col. San Diego: Academic Press.

Bandín, I., Olveira, J. G., Borrego, J. J., Dopazo, C. P., & Barja, J. L. (2006). Susceptibility of the fish cell line SAF-1 to betanodavirus. *Journal of Fish Diseases*, 29(10), 633-636.

Bandín, I., Souto, S., Cutrín, J. M., López-Vázquez, C., Olveira, J. G., Esteve, C., Alcaide, E., & Dopazo, C. P. (2014). Presence of viruses in wild eels *Anguilla anguilla* L, from the Albufera Lake (Spain). *Journal of Fish Diseases*, 37(7), 597-607.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Bandín, I., & Dopazo, C. P. (2011). Host range, host specificity and hypothesized host shift events among viruses of lower vertebrates. *Veterinary Research*, 42(1), 1-15.

Bandín, I., & Souto, S. (2020). Betanodavirus and VER disease: A 30-year research review. *Pathogens*, 9(2), 106.

Banu, G. R., Mori, K.-I., Arimoto, M., & Nakai, T. (2007). Fate of Betanodaviruses in the Experimentally Infected Natural and Non-Natural Host. *Bangladesh Journal of Microbiology*, 24(2), 100-104.

Banu, H., Pattanayak, S., Sundaray, J.K., & Sahoo, P.K. (2019). Genetic diversity and latency status of betanodavirus in wild seeds of Asian seabass *Lates calcarifer* (Bloch) sampled along Indian coasts. *Indian Journal of Geo Marine Sciences*, 48 (3), 288-293.

Barja, J. L., Toranzo, A. E., Lemos, M. L., & Hetrick, F. M. (1983). Influence of water temperature and salinity on the survival of IPN and IHN viruses. *Bulletin of European Association of Fish Pathologists*, 3(4), 47–50.

Barker, D. E., MacKinnon, A. M., Boston, L., Burt, M. D. B., Cone, D. K., Speare, D. J., Griffiths, S., Cook, M., Ritchie, R., & Olivier, G. (2002). First report of piscine nodavirus infecting wild winter flounder *Pleuronectes americanus* in Passamaquoddy Bay, New Brunswick, Canada. *Diseases of Aquatic Organisms*, 49(2), 99-105.

Barsøe, S., Skovgaard, K., Sepúlveda, D., Stratmann, A., Vendramin, N., & Lorenzen, N. (2021). Nervous necrosis virus-like particle (VLP) vaccine stimulates European sea bass innate and adaptive immune responses and induces long-term protection against disease. *Pathogens*, 10,1477.

Basu, N., Nakano, T., Grau, E. G., & Iwama, G. K. (2001). The effects of cortisol on heat shock protein 70 levels in two fish species. *General and Comparative Endocrinology*, 124(1), 97–105.

Baud, M., Cabon, J., Salomoni, A., Toffan, A., Panzarin, V., & Bigarré, L. (2015). First generic one step real-time Taqman RT-PCR targeting the RNA1 of betanodaviruses. *Journal of Virological Methods*, 211, 1-7.

Beal, C. M., Gerber, L. N., Thongrod, S., Phromkunthong, W., Kiron, V., Granados, J., Archibald, I., Greene, C.H., & Huntley, M. E. (2018). Marine microalgae commercial production improves sustainability of global fisheries and aquaculture. *Scientific Reports*, 8(1), 1-8.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Bengtson, D. A., Léger, P., & Sorgeloos, P. (1991). Use of artemia as a food source for aquaculture. In *Artemia Biology*, 255–286. Edited by Browne, R.A., Sorgoeloos, P., Trotman, C.N.A, Boca Ratón, Florida.

Biasini L, Berto P, Abbadi M, Buratin A, Toson M, Marsella A, Toffan A, Pascoli F. (2022). Pathogenicity of Different Betanodavirus RGNNV/SJNNV Reassortant Strains in European Sea Bass. *Pathogens*, 11(4):458.

Bildik, A., Asıcı E, G., Akdeniz, G., & Kıral, F. (2019). Effect of enviromental temperature on heat shock proteins (HSP30, HSP70, HSP90) and IGF-I mRNA expression in *Sparus aurata*. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 18(4), 1014–1024.

Binesh, C. P., & Greeshma, C. (2013). Genomic classification of betanodavirus by molecular phylogenetic analysis of the coat protein gene. *Archives of Virology*, 158(7), 1589-1594.

Bitchava, K., Chassalevris, T., Lampou, E., Athanassopoulou, F., Economou, V., & Dovas, C. I. (2019). Occurrence and molecular characterization of betanodaviruses in fish and invertebrates of the Greek territorial waters. *Journal of Fish Diseases*, 00(12), 1-11.

Bloch, B., Gravningen, K., & Larsen, J. (1991). Encephalomyelitis among turbot associated with a picornavirus-like agent. *Diseases of Aquatic Organisms*, 10(1984), 65-70.

Boonyaratpalin, S., Supamattaya, K., Kasornchandra, J., & Hoffmann, R. W. (1996). Picorna-like virus associated with mortality and a spongious encephalopathy in grouper *Epinephelus malabaricus*. *Disease of Aquatic Organisms*, 26(1), 75-80.

Boukedjouta, R., Pretto, T., Abbadi, M., Biasini, L., Toffan, A., & Mezali, K. (2020). Viral encephalopathy and retinopathy is endemic in wild groupers (genus *Epinephelus* spp.) of the Algerian coast. *Journal of Fish Diseases*, 43(7), 801-812.

Breuil, G., Bonami, J. R., Pepin, J. F., & Pichot, Y. (1991). Viral infection (picorna-like virus) associated with mass mortalities in hatchery-reared seabass (*Dicentrarchus labrax*) larvae and juveniles. *Aquaculture*, 97(2-3), 109-116.

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.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Breuil, G., Pépin, J., Boscher, S., & Thiéry, R. (2002). Experimental vertical transmission of nodavirus from broodfish to eggs and larvae of the sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.). *Journal of Fish Diseases*, 25, 697-702.

Breuil, G., Vassiloglou, B., Pepin, J. F., & Romestand, B. (1997). Ontogeny of IgM-bearing cells and changes in the immunoglobulin M-like protein level (IgM) during larval stages in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Fish and Shellfish immunology*, 7, 29-43.

Breuil, G., & Romestand, B. (1999). A rapid ELISA method for detecting specific antibody level against nodavirus in the serum of the sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.): Application to the screening of spawners in a sea bass hatchery. *Journal of Fish Diseases*, 22(1), 45-52.

Brudeseth, B. E., Wiulsrød, R., Fredriksen, B. N., Lindmo, K., Løkling, K. E., Bordevik, M., Steine, N., Klevan, A., & Gravningen, K. (2013). Status and future perspectives of vaccines for industrialised fin-fish farming. *Fish and Shellfish Immunology*, 35(6), 1759-1768.

Buonocore, F., Nuñez-Ortiz, N., Picchietti, S., Randelli, E., Stocchi, V., Guerra, L., Toffan, A., Pascoli, F., Fausto, A.M., Mazzini, M., & Scapigliati, G. (2019). Vaccination and immune responses of European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) against betanodavirus. *Fish and Shellfish Immunology*, 85, 78-84.

Campbell, J. A., & Lenschow, D. J. (2013). Emerging roles for immunomodulatory functions of free ISG15. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, 33(12), 728-738.

Cano, I., Ortiz-Delgado, J.B., García-Rosado, E., López-Jimena, B., Alonso, M.C., Castro, D., Sarasquete, C., & Borrego, J.J. (2001). *Artemia* sp. como potencial vector de transmisión del virus de linfocistis (LCDV). *XI Congreso Nacional de Acuicultura*.

Carballo, C., Garcia-Rosado, E., Borrego, J. J., & Alonso, M. C. (2016). SJNNV down-regulates RGNNV replication in European sea bass by the induction of the type I interferon system. *Veterinary Research*, 47, 6.

Carballo, C., Ortiz-Delgado, J. B., Berbel, C., Castro, D., Borrego, J. J., Sarasquete, C., & Manchado, M. (2019). Feed and immersion challenges with lymphocystis disease virus (LCDV) reveals specific mechanisms for horizontal transmission and immune response in senegalese sole post-larvae. *Fish and Shellfish Immunology*, 89, 710–718.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Carbone, D. A., Pellone, P., Lubritto, C., & Ciniglia, C. (2021). Evaluation of microalgae antiviral activity and their bioactive compounds. *Antibiotics*, 10(6).

Castric, J., Thiéry, R., Jeffroy, J., de Kinkelin, P., & Raymond, J. C. (2001). Sea bream *Sparus aurata*, an asymptomatic contagious fish host for nodavirus. *Diseases of Aquatic Organisms*, 47, 33-38.

Castro, A., Montes, M., Orihuela, L., Linares, J., Cota, N., Carrera, L., Toledo, P., & Lazo, J. P. (2019). Effect of stocking density on growth and survival of fine flounder *Paralichthys adspersus* (Steindachner, 1867) larvae. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 47(1), 1–8

Chang, C. W., Su, Y. C., Her, G. M., Ken, C. F., & Hong, J. R. (2011). Betanodavirus induces oxidative Stress-Mediated cell death that prevented by Antioxidants and zfcatalase in fish cells. *PLoS ONE*, 6(10).

Chang, J.S., & Chi, S.C. (2015). GHSC70 Is Involved in the Cellular Entry of Nervous Necrosis Virus. *Journal of Virology*, 89(1), 61-70.

Chaves-Pozo, E., Guardiola, F. A., Meseguer, J., Esteban, M. A., & Cuesta, A. (2012). Nodavirus infection induces a great innate cell-mediated cytotoxic activity in resistant, gilthead seabream, and susceptible, European sea bass, teleost fish. *Fish and Shellfish Immunology*, 33(5), 1159-1166.

Chen, C. W., Wu, M. S., Huang, Y. J., Cheng, C. A., & Chang, C. Y. (2015a). Recognition of linear B-cell epitope of Betanodavirus coat protein by RG-M18 neutralizing mAB inhibits giant grouper nervous necrosis virus (GGNNV) infection. *PLoS ONE*, 10(5).

Chen, H. Y., Liu, W., Wu, S. Y., Chiou, P. P., Li, Y. H., Chen, Y. C., Lin, G.H., Lu, M-W., & Wu, J. L. (2015b). RIG-I specifically mediates group II type I IFN activation in nervous necrosis virus infected zebrafish cells. *Fish and Shellfish Immunology*, 43(2), 427-435.

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.

Chen, N. C., Yoshimura, M., Guan, H. H., Wang, T. Y., Misumi, Y., Lin, C. C., Chuankhayan, P., Nakagawa, A., Chan, S.I., Tsukihara, T., Chen, T-Y., & Chen, C. J. (2015c). Crystal Structures of a Piscine Betanodavirus: Mechanisms of Capsid Assembly and Viral Infection. *PLoS Pathogens*, 11(10), 1-25.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Chen, S. P., Wu, J. L., Su, Y. C., & Hong, J. R. (2007). Anti-Bcl-2 family members, zfBcl-xL and zfMcl-1a, prevent cytochrome c release from cells undergoing betanodavirus-induced secondary necrotic cell death. *Apoptosis*, 12(6), 1043-1060.

Chen, S. P., Yang, H. L., Her, G. M., Lin, H. Y., Jeng, M. F., Wu, J. L., & Hong, J. R. (2006). Betanodavirus induces phosphatidylserine exposure and loss of mitochondrial membrane potential in secondary necrotic cells, both of which are blocked by bongkrekic acid. *Virology*, 347(2), 379-391.

Chen, Y. M., Shih, C. H., Liu, H. C., Wu, C. L., Lin, C. C., Wang, H. C., Chen, T-Y., Yang, H-L., & Lin, J. H. Y. (2011a). An oral nervous necrosis virus vaccine using *Vibrio anguillarum* as an expression host provides early protection. *Aquaculture*, 321(1-2), 26-33.

Chen, Y. M., Kuo, C. E., Lin, C. M., Shiea, P. S., & Chen, T. Y. (2011b). Cloning of crystallin from orange-spotted grouper and characterization of its activity as potential protective agent. *Results in Immunology*, 1(1), 60-69.

Chen, Y. M., Wang, T. Y., & Chen, T. Y. (2014). Immunity to betanodavirus infections of marine fish. *Developmental and Comparative Immunology*, 43(2), 174-183.

Cheng, Y. K., Wu, Y. C., & Chi, S. C. (2017). Humoral and cytokine responses in giant groupers after vaccination and challenge with betanodavirus. *Developmental and Comparative Immunology*, 67, 385-394.

Chi, S. C., Lo, B. J., & Lin, S. C. (2001). Characterization of grouper nervous necrosis virus (GNNV). *Journal of Fish Diseases*, 24(1), 3-13.

Chi, S. C., Shieh, J. R., & Lin, S. J. (2003). Genetic and antigenic analysis of betanodaviruses isolated from aquatic organisms in Taiwan. *Diseases of Aquatic Organisms*, 55(3), 221-228.

Chia, T. J., Wu, Y. C., Chen, J. Y., & Chi, S. C. (2010). Antimicrobial peptides (AMP) with antiviral activity against fish nodavirus. *Fish and Shellfish Immunology*, 28(3), 434-439.

Chiang, Y.-H., Wu, Y.-C., & Chi, S.-C. (2017). Interleukin-1β secreted from betanodavirus-infected microglia caused the death of neurons in giant grouper brains. *Developmental & Comparative Immunology*, 70, 19-26.

Cho, H. S., Seo, J. Y., Park, S. I., Kim, T. G., & Kim, T. J. (2018). Oral immunization with recombinant protein antigen expressed in tobacco against fish nervous necrosis virus. *Journal of Veterinary Medical Science*, 80(2), 272-279.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Cho, S. Y., Kim, H. J., Lan, N. T., Han, H. J., Lee, D. C., Hwang, J. Y., Kwon, M-G., Knag, B. K., Han, S.Y., Moon, H., Kang, H.A., & Kim, H. J. (2017). Oral vaccination through voluntary consumption of the convict grouper *Epinephelus septemfasciatus* with yeast producing the capsid protein of red-spotted grouper nervous necrosis virus. *Veterinary Microbiology*, 204, 159-164.

Ciji, A., & Akhtar, M. S. (2020). Nitrite implications and its management strategies in aquaculture: a review. *Reviews in Aquaculture*, 12(2), 878-908.

Ciulli, S., Galletti, E., Grodzki, M., Alessi, A., Battilani, M., & Prosperi, S. (2007). Isolation and genetic characterization of betanodavirus from wild marine fish from the Adriatic Sea. *Veterinary Research Communications*, 31, 221-224.

Ciulli, S., Grodzki, M., Bignami, G., Serratore, P., & Prosperi, S. (2010). Molecular detection and genetic analysis of betanodavirus in bivalve mollusks. *Journal of Biotechnology*, 150S, S1-S576.

Colgrave, M. L., Dominik, S., Tobin, A. B., Stockmann, R., Simon, C., Howitt, C. A., Belobrajdic, D. P., Paull, C., & Vanhercke, T. (2021). Perspectives on Future Protein Production. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69(50), 15076-15083.

Comps, M., Pépin, J. F., & Bonami, J. R. (1994). Purification and characterization of two fish encephalitis viruses (FEV) infecting *Lates calcarifer* and *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture*, 123(1-2), 1-10.

Comps, M., Trindade, M., & Delsert, C. (1996). Investigation of fish encephalitis viruses (FEV) expression in marine fishes using DIG-labelled probes. *Aquaculture*, 143(2), 113-121.

Cordeiro, O. D., Silva, T. S., Alves, R. N., Costas, B., Wulff, T., Richard, N., de Vareilles, M., Conceiçao, L. E. C., & Rodrigues, P. M. (2012). Changes in Liver Proteome Expression of Senegalese Sole (*Solea senegalensis*) in Response to Repeated Handling Stress. *Marine Biotechnology*, 14(6), 714–729.

Corre, V., Faisan, J., Carton-Kawagoshi, R. J., Elle, B. J., Traifalgar, R. F., & Caipang, C. M. (2012). Evidence of WSSV transmission from the rotifer (*Brachionus plicatilis*) to the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) postlarvae and means to control rotifer resting eggs using industrial disinfectants. *Aquaculture, Aquarium, Conservation & Legislation International Journal of the Bioflux Society*, 5(2), 64–68.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Costa, J. Z., Adams, A., Bron, J. E., Thompson, K. D., Starkey, W. G., & Richards, R. H. (2007). Identification of B-cell epitopes on the betanodavirus capsid protein. *Journal of Fish Diseases*, 30(7), 419-426.

Costa, J. Z., & Thompson, K. D. (2016). Understanding the interaction between Betanodavirus and its host for the development of prophylactic measures for viral encephalopathy and retinopathy. *Fish and Shellfish Immunology*, 53, 35-49.

Costas, B., Aragão, C., Mancera, J. M., Dinis, M. T., Conceição, L. E. C., & Refojos, B. C. (2008). High stocking density induces crowding stress and affects amino acid metabolism in Senegalese sole *Solea senegalensis* (Kaup 1858) juveniles. *Aquaculture Research*, 39(1), 1–9.

Criel, G. R. J., & Macrae, T. H. (2002). Artemia Morphology and Structure. In *Artemia: Basic and Applied Biology* (pp. 1–37). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.

Curtis, P. A., Drawbridge, M., Iwamoto, T., Nakai, T., Hedrick, R. P., & Gendron, A. P. (2001). Nodavirus infection of juvenile white seabass, *Atractoscion nobilis*, cultured in southern California: First record of viral nervous necrosis (VNN) in North America. *Journal of Fish Diseases*, 24(5), 263-271.

Cutrín, J. M., Dopazo, C. P., Thiéry, R., Leao, P., Olveira, J. G., Barja, J. L., & Bandín, 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.

Czabotar, P. E., Lessene, G., Strasser, A., & Adams, J. M. (2014). Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: Implications for physiology and therapy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(1), 49-63.

da Costa, O. T. F., Dias, L. C., Malmann, C. S. Y., Lima Ferreira, C. A. de, Carmo, I. B. do, Wischneski, A. G., de Sousa, R. L., Cavero, B. A. S., Lameira, J. L. V., & Dos-Santos, M. C. (2019). The effects of stocking density on the hematology, plasma protein profile and immunoglobulin production of juvenile tambaqui (*Colossoma macropomum*) farmed in Brazil. *Aquaculture*, 499, 260–268.

da Silva, S. M. B. C., Lavander, H. D., de Santana Luna, M. M., de Melo Eloi da Silva, A. O., Gálvez, A. O., & Coimbra, M. R. M. (2015). *Artemia franciscana* as a vector for infectious myonecrosis virus (IMNV) to *Litopenaeus vannamei* juvenile. *Journal of Invertebrate Pathology*, 126, 1–5.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Dalla Valle, L., Zanella, L., Patarnello, P., Paolucci, L., Belvedere, P., & Colombo, L. (2000). Development of a sensitive and quantitative diagnostic assay for fish nervous necrosis virus based on two-target real-time PCR. *Journal of Fish Diseases*, 23, 321-327.

Darriba, D., Taboada, G., Doallo, R., & Posada, D. (2012). jModelTest2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, 9(8), 772.

Deane, E. E., & Woo, N. Y. S. (2007). Impact of nitrite exposure on endocrine, osmoregulatory and cytoprotective functions in the marine teleost *Sparus sarba*. *Aquatic Toxicology*, 82(2), 85–93.

Delsert, C., Morin, N., & Comps, M. (1997). A fish encephalitis virus that differs from other nodaviruses by its capsid protein processing. *Archives of Virology*, 142(12), 2359-2371.

Dhont, J., Dierckens, K., Støttrup, J., Van Stappen, G., Wille, M., & Sorgeloos, P. (2013). Rotifers, Artemia and copepods as live feeds for fish larvae in aquaculture. In *Advances in Aquaculture Hatchery Technology*, 157–202. Edited by G. Allan & G. Burnell, Cambridge: Woodhead Publishing Limited.

Doan, Q. K., Vandeputte, M., Chatain, B., Morin, T., & Allal, F. (2017). Viral encephalopathy and retinopathy in aquaculture: a review. *Journal of Fish Diseases*, 40(5), 717-742.

Du, F., Li, Y., Tang, Y., Su, S., Yu, J., Yu, F., Li, J., Li, H., Wang, M., & Xu, P. (2019). Response of the gut microbiome of *Megalobrama amblycephala* to crowding stress. *Aquaculture*, 500, 586–596.

Eckerle, L. D., & Ball, L. A. (2002). Replication of the RNA Segments of a Bipartite Viral Genome Is Coordinated by a Transactivating Subgenomic RNA. *Virology*, 296(1), 165-176.

Ellis, R. P., Urbina, M. A., & Wilson, R. W. (2017). Lessons from two high CO_2 worlds – future oceans and intensive aquaculture. *Global Change Biology*, 23(6), 2141-2148.

Errani, F., Ponti, M., Volpe, E., & Ciulli, S. (2021). Spatial and seasonal variability of human and fish viruses in mussels inside and offshore of Ravenna's harbour (Adriatic Sea, Italy). *Journal of Applied Microbiology*, 130(3), 994-1008.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Eryalçın, K. M. (2018). Effects of Different Commercial Feeds and Enrichments on Biochemical Composition and Fatty Acid Profile of Rotifer (*Brachionus Plicatilis*, Müller 1786) and *Artemia franciscana*. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 18, 81–90.

Eryalçın, K. M. (2019). Nutritional value and production performance of the rotifer *Brachionus plicatilis* Müller, 1786 cultured with different feeds at commercial scale. *Aquaculture International*, 27(3), 875–890.

Falaise, C., François, C., Travers, M. A., Morga, B., Haure, J., Tremblay, R., Turcotte, F., Pasetto, P., Gastineau, R., Hardivillier, Y., Leignel, V., & Mouget, J. L. (2016). Antimicrobial compounds from eukaryotic microalgae against human pathogens and diseases in aquaculture. *Marine Drugs*, 14(9), 1–27.

Falco, A.; Bello-Perez, M.; Díaz-Puertas, R.; Mold, M.; Adamek, M. (2021) Update on the Inactivation Procedures for the Vaccine Development Prospects of a New Highly Virulent RGNNV Isolate. *Vaccines*, 9, 1441.

FAO. (2018). El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2018. Cumplir los objetivos de desarrollo sostenible. Roma.

FAO. (2020). El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2020. Cumplir los objetivos de desarrollo sostenible. Roma.

FEAP. (2020). European Aquaculture Production Report 2014-2019.

Fenner, B. J., Du, Q., Goh, W., Thiagarajan, R., Chua, H. K., & Kwang, J. (2006a). Detection of betanodavirus in juvenile barramundi, *Lates calcarifer* (Bloch), by antigen capture ELISA. *Journal of Fish Diseases*, 29(7), 423-432.

Fenner, B. J., Thiagarajan, R., Chua, H. K., & Kwang, J. (2006b). Betanodavirus B2 Is an RNA Interference Antagonist That Facilitates Intracellular Viral RNA Accumulation. *Journal of Virology*, 80(1), 85-94.

Ferreira, H., Ramalho, A., Dias, J., Yúfera, M., Arias, A., Falcão, M., Serpa, D., Aires, T., Pousao-Ferreira, P., Cunha, M. E., Valente, L. M. P., Dinis, M. T., & Conceição, L. (2010). Sustainable semi-intensive polyculture of seabream and sole in earthen ponds. *Aquaculture Europe*, 35(September), 17–21.

Ferreira, M., Cortina-Burgueño, Á., Freire, I., & Otero, A. (2018). Effect of nutritional status and concentration of *Nannochloropsis gaditana* as enrichment diet for the marine rotifer *Brachionus* sp. *Aquaculture*, 491, 351–357.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Fichi, G., Cardeti, G., Cersini, A., Mancusi, C., Guarducci, M., Di Guardo, G., & Terracciano, G. (2016). Bacterial and viral pathogens detected in sea turtles stranded along the coast of Tuscany, Italy. *Veterinary Microbiology*, 185, 56-61.

Fichi, G., Cardeti, G., Perrucci, S., Vanni, A., Cersini, A., Lenzi, C., De Wolf, T., Fronte, B., Guarducci, M., & Susini, F. (2015). Skin lesion-associated pathogens from *Octopus vulgaris*: First detection of *Photobacterium swingsii*, *Lactococcus garvieae* and betanodavirus. *Diseases of Aquatic Organisms*, 115(2), 147-156.

Fisher, A. J., & Johnson, E. J. (1993). Ordered duplex RNA controls capsid architecture in an icosahedral animal virus. Nature, 361, 176-179.

Frerichs, G. N., Rodger, H. D., & Peric, Z. (1996). Cell culture isolation of piscine neuropathy nodavirus from juvenile sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Journal of General Virology*, 77(9), 2067-2071.

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(1–2), 13–24.

Fukuda, Y., Nguyen, H. D., Furuhashi, M., & Nakai, T. (1996). Mass mortality of cultured sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus*, associated with viral nervous necrosis. *Fish Pathology*, 31(3), 165-170.

Gagné, N., Johnson, S. C., Cook-Versloot, M., MacKinnon, A. M., & Olivier, G. (2004). Molecular detection and characterization of nodavirus in several marine fish species from the northeastern Atlantic. *Diseases of Aquatic Organisms*, 62(3), 181-189.

Garver, K. A., Mahony, A. A. M., Stucchi, D., Richard, J., Van Woensel, C., & Foreman, M. (2013). Estimation of parameters influencing waterborne transmission of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) in atlantic salmon (*Salmo salar*). *PLoS ONE*, 8(12), e82296.

Giacopello, C., Foti, M., Bottari, T., Fisichella, V., & Barbera, G. (2013). Detection of viral encephalopathy and retinopathy virus (VERV) in wild marine fish species of the South Tyrrhenian Sea (Central Mediterranean). *Journal of fish diseases*, 36, 819-821.

Gjessing, M. C., Kvellestad, A., Ottesen, K., & Falk, K. (2009). Nodavirus provokes subclinical encephalitis and retinochoroiditis in adult farmed Atlantic cod, *Gadus morhua* L. *Journal of Fish Diseases*, 32(5), 421-431.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

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. *Journal of Fish Diseases*, 13(3), 245-249.

Glazebrook, J., & Campbell, R. (1987). Diseases of barramundi: A review. In: J. Coppland & D. Grey (Eds.), Management of Wild and Cultured Sea Bass / Barramundi (*Lates calcarifer*), Proceedings of an international workshop Darwin, N. T. Australia (pp. 204-206). Australian Center for International Agricultural Research (ACIAR): Camberra, Australia.

Goh, Z. H., Syakirin Mohd, N. A., Tan, S. G., Bhassu, S., & Tan, W. S. (2014). RNA-binding region of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus capsid protein. *Journal of General Virology*, 95, 1919–1928.

Gomez-Casado, E., Estepa, A., & Coll, J. M. (2011). A comparative review on European-farmed finfish RNA viruses and their vaccines. *Vaccine*, 29(15), 2657-2671.

Gomez, D. K., Sato, J., Mushiake, K., Isshiki, T., Okinaka, Y., & Nakai, T. (2004). PCR-based detection of betanodaviruses from cultured and wild marine fish with no clinical signs. *Journal of Fish Diseases*, 27(10), 603-608.

Gomez, D. K., Mori, K-I., Okinaka, Y., Nakai, T., & Park, S. C. (2010). Trash fish can be a source of betanodaviruses for cultured marine fish. *Aquaculture*, 302(3-4), 158-163.

Gomez, D. K., Baeck, G. W., Kim, J. H., Choresca, C. H., & Park, S. C. (2008a). Genetic analysis of betanodaviruses in subclinically infected aquarium fish and invertebrates. *Current Microbiology*, 56(5), 499-504.

Gomez, D. K., Baeck, G. W., Kim, J. H., Choresca, C. H., & Park, S. C. (2008b). Molecular detection of betanodavirus in wild marine fish populations in Korea. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 20, 38-44.

Gomez, D. K., Lim, D.J., Baeck, G.W., Youn, H.J., Shin, N.S., Youn, H.Y., Hwang, C.Y., Park, J.H., & Park, S.C. (2006). Detection of betanodaviruses in apparently healthy aquarium fishes and invertebrates. *Journal of Veterinary Science*, 7(4), 369-374.

González-Mira, A., Varó, I., Solé, M., & Torreblanca, A. (2016). Drugs of environmental concern modify *Solea senegalensis* physiology and biochemistry in a temperature-dependent manner. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(20), 20937–20951.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Gonzalez-Silvera, D., Guardiola, F. A., Espinosa, C., Chaves-Pozo, E., Esteban, M. Á., & Cuesta, A. (2019). Recombinant nodavirus vaccine produced in bacteria and administered without purification elicits humoral immunity and protects European sea bass against infection. *Fish and Shellfish Immunology*, 88(March), 458-463.

Grisez, L., Chair, M., Sorgeloos, P., & Ollevier, F. (1996). Mode of infection and spread of *Vibrio anguillarum* in turbot *Scophthalmus maximus* larvae after oral challenge through live feed. *Disease of Aquatic Organisms*, 26(3), 181–187.

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. *Diseases of Aquatic Organisms*, 36(2), 95-106.

Grotmol, S., Nerland, A. H., Biering, E., Totland, G. K., & Nishizawa, T. (2000). Characterisation of the capsid protein gene from a nodavirus strain affecting the Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* and design of an optimal reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) detection assay. *Diseases of Aquatic Organisms*, 39(2), 79-88.

Grotmol, S., Totland, G. K., & Kryvi, H. (1997). Detection of a nodavirus-like agent in heart tissue from reared Atlantic salmon *Salmo salar* suffering from cardiac myopathy syndrome (CMS). *Diseases of Aquatic Organisms*, 29(2), 79-84.

Grove, S., Johansen, R., Reitan, L. J., Press, C. M. L., & Dannevig, B. H. (2006). Quantitative investigation of antigen and immune response in nervous and lymphoid tissues of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) challenged with nodavirus. *Fish and Shellfish Immunology*, 21(5), 525-539.

Guo, Y. X., Chan, S.W., & Kwang, J. (2004). Membrane Association of Greasy Grouper Nervous Necrosis Virus Protein A and Characterization of Its Mitochondrial Localization Targeting Signal. *Journal of Virology*, 78(12), 6498-6508.

Guo, Y. X., Wei, T., Dallmann, K., & Kwang, J. (2003). Induction of caspase-dependent apoptosis by betanodaviruses GGNNV and demonstration of protein α as an apoptosis inducer. *Virology*, 308(1), 74-82.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Gye, H. J., & Nishizawa, T. (2016). Dialysis buffer with different ionic strength affects the antigenicity of cultured nervous necrosis virus (NNV) suspensions. *Virus Research*, 223, 108–114.

Gye, H. J., & Nishizawa, T. (2018). Reducing background optical density in enzyme-linked immunosorbent assay for detecting nervous necrosis virus (NNV)-specific IgM by immobilizing fish sera. *Aquaculture*, 485, 93-100.

Gye, H. J., & Nishizawa, T. (2019). Altered conformational structures of nervous necrosis virus surface protrusions and free coat proteins after incubation at moderate-low temperatures. *Scientific Reports*, 9:8647.

Gye, H. J., & Nishizawa, T. (2021). Sites responsible for infectivity and antigenicity on nervous necrosis virus (NNV) appear to be distinct. *Scientific Reports*, 11(1), 1-9.

Gyu, S. S., Myoung-Ae, P., Saeng-Dong, L., & Seh-Kyu, C. (1991). Studies on the mass mortality of the cultured grouper, *Epinephelus septemfasciatus*. *Journal of Fish Pathology*, 4(2), 87-94.

Haddad-Boubaker, S., Boughdir, W., Sghaier, S., Souissi, J. B., Megdich, A., Dhaouadi, R., Amara, A., Panzarin, V., & Fakhfakh, E. (2013). Outbreak of viral nervous necrosis in endangered fish species *Epinephelus costae* and *E. marginatus* in Northern Tunisian coasts. *Fish pathology*, 49 (2), 53-56.

Hameed, A. S., Ninawe, A. S., Nakai, T., Chi, S. C., & Johnson, K. L. (2019). ICTV virus taxonomy profile: Nodaviridae. *Journal of General Virology*, 100(1), 3-4.

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.

Hawley, L. M., & Garver, K. A. (2008). Stability of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) in freshwater and seawater at various temperatures. *Diseases of Aquatic Organisms*, 82(3), 171–178. https://doi.org/10.3354/dao01998

Hazreen-Nita, M., Azila, A., Mukai, Y., Firdaus-Nawi, M., & Nur-Nazifah, M. (2019). A review of betanodavirus vaccination as preventive strategy to viral nervous necrosis (VNN) disease in grouper. *Aquaculture International* 2019 27:5, 27(5), 1565-1577.

He, M., & Teng, C. B. (2015). Divergence and codon usage bias of Betanodavirus, a neurotropic pathogen in fish. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 83, 137-142.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Hegde, A., Chen, C. L., Qin, Q. W., Lam, T. J., & Sin, Y. M. (2002). Characterization, pathogenicity and neutralization studies of a nervous necrosis virus isolated from grouper, *Epinephelus tauvina*, in Singapore. *Aquaculture*, 213(1-4), 55-72.

Hegde, A., Teh, H. C., Lam, T. J., & Sin, Y. M. (2003). Nodavirus infection in freshwater ornamental fish, guppy, *Poicelia reticulata* - Comparative characterization and pathogenicity studies. *Archives of Virology*, 148(3), 575-586.

Hemaiswarya, S., Raja, R., Kumar, R. R., Ganesan, V., & Anbazhagan, C. (2011). Microalgae: A sustainable feed source for aquaculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(8), 1737–1746.

Hernández-Corona, A., Nieves, I., Meckes, M., Chamorro, G., & Barron, B. L. (2002). Antiviral activity of *Spirulina maxima* against herpes simplex virus type 2. *Antiviral Research*, 56(3), 279–285.

Hick, P., Schipp, G., Bosmans, J., Humphrey, J., & Whittington, R. (2011). Recurrent outbreaks of viral nervous necrosis in intensively cultured barramundi (*Lates calcarifer*) due to horizontal transmission of betanodavirus and recommendations for disease control. *Aquaculture*, 319(1-2), 41-52.

Hick, P., & Whittington, R. J. (2010). Optimisation and validation of a real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay for detection of betanodavirus. *Journal of Virological Methods*, 163(2), 368-377.

Hixson, S. M. (2014). Fish nutrition and current issues in aquaculture: The Balance in providing safe and nutritious seafood, in an environmentally sustainable manner. *Journal of Aquaculture Research and Development*, 5(3).

Ho, K. L., Gabrielsen, M., Beh, P. L., Kueh, C. L., Thong, Q. X., Streetley, J., Tan, W. S., & Bhella, D. (2018). Structure of the *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus: A new genus within the Nodaviridae? *PLoS Biology*, 16(10), 1-20.

Hodneland, K., García, 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.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Hong, J., Chen, X., Liu, S., Fu, Z., Han, M., Wang, Y., Gu, Z., & Ma, Z. (2019). Impact of fish density on water quality and physiological response of golden pompano (*Trachinotus ovatus*) flingerlings during transportation. *Aquaculture*, 507(February), 260–265.

Hrubec, T. C., Robertson, J. L., Smith, S. A., & Tinker, M. K. (1996). The effect of temperature and water quality on antibody response to *Aeromonas salmonicida* in sunshine bass (*Morone chrysops* x *Morone saxatilis*). *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 50(1–2), 157–166.

Huang, B., Tan, C., Chang, S. F., Munday, B., Mathew, J. A., Ngoh, G. H., & Kwang, J. (2001). Detection of nodavirus in barramundi, *Lates calcarifer* (Bloch), using recombinant coat protein-based ELISA and RT-PCR. *Journal of Fish Diseases*, 24(3), 135-141.

Huang, P. Y., Hsiao, H. C., Wang, S. W., Lo, S. F., Lu, M. W., & Chen, L. L. (2020). Screening for the Proteins That Can Interact with Grouper Nervous Necrosis Virus Capsid Protein. *Viruses*, 12(9), 1-20.

Huang, R., Zhou, Q., Shi, Y., Zhang, J., He, J., & Xie, J. (2018). Protein A from orange-spotted nervous necrosis virus triggers type I interferon production in fish cell. *Fish and Shellfish Immunology*, 79(February), 234-243.

Huang, R., Zhu, G., Zhang, J., Lai, Y., Xu, Y., He, J., & Xie, J. (2017). Betanodavirus-like particles enter host cells via clathrin-mediated endocytosis in a cholesterol-, pH- and cytoskeleton-dependent manner. *Veterinary research*, 48(1).

Huang, Y.C., & Han, Y.S. (2014). Determining anti-betanodavirus compounds through a GF-1 cell-based screening platform. *Antiviral Research*, 105, 47-53.

Huheihel, M., Ishanu, V., Tal, J., & Arad, S. (2002). Activity of *Porphyridium* sp. polysaccharide against herpes simplex viruses in vitro and in vivo. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 50(2–3), 189–200.

Húsgard, 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 Sc*ophthalmus maximus* and Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus*, and evaluation of a vaccine against SJNNV. *Diseases of Aquatic Organisms*, 45(1), 33-44.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Hwang, J., Suh, S. S., Park, M., Oh, M. J., Kim, J. O., Lee, S., & Lee, T. K. (2016). Detection of coat protein gene of nervous necrosis virus using loop-mediated isothermal amplification. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 9(3), 235-240.

ICTV. (2022). Virus taxonomy. *Classification and nomenclature of viruses*. International Committee on Taxonomy of Viruses.

Iguchi, K., Ogawa, K., Nagae, M., & Ito, F. (2003). The influence of rearing density on stress response and disease susceptibility of ayu (*Plecoglossus altivelis*). *Aquaculture*, 220(1–4), 515–523.

Ikenaga, T., Tatecho, Y., Nakai, T., & Uematsu, K. (2002). Betanodavirus as a novel transneuronal tracer for fish. *Neuroscience Letters*, 331(1), 55-59.

Inendino, K. R., Grant, E. C., Philipp, D. P., & Goldberg, T. L. (2005). Effects of factors related to water quality and population density on the sensitivity of juvenile largemouth bass to mortality induced by viral infection. *Journal of Aquatic Animal Health*, 17(4), 304–314.

Ito, Y., Okinaka, Y., Mori, K. I., Sugaya, T., Nishioka, T., Oka, M., & Nakai, T. (2008). Variable region of betanodavirus RNA2 is sufficient to determine host specificity. *Diseases of Aquatic Organisms*, 79(3), 199-205.

Iwama, G. K., Afonso, L. O. B., Todgham, A., Ackerman, P., & Nakano, K. (2004). Are hsps suitable for indicating stressed states in fish? *Journal of Experimental Biology*, 207(1), 15–19.

Iwamoto, T., Nakai, T., Mori, K., Arimoto, M., & Furusawa, I. (2000). Cloning of the fish cell line SSN-1 for piscine nodaviruses. *Diseases of Aquatic Organisms*, 43(2), 81-89.

Iwamoto, T., Mise, K., Takeda, A., Okinaka, Y., Mori, K. I., Arimoto, M., Okuno, T., & Nakai, T. (2005). Characterization of striped jack nervous necrosis virus subgenomic RNA3 and biological activities of its encoded protein B2. *Journal of General Virology*, 86(10), 2807-2816.

Iwamoto, T., Okinaka, Y., Mise, K., Mori, K.-I., Arimoto, M., Okuno, T., & Nakai, T. (2004). Identification of Host-Specificity Determinants in Betanodaviruses by Using Reassortants between Striped Jack Nervous Necrosis Virus and Sevenband Grouper Nervous Necrosis Virus. *Journal of Virology*, 78(3), 1256-1262.

Jaramillo, D., Hick, P., & Whittington, R. J. (2017). Age dependency of nervous necrosis virus infection in barramundi *Lates calcarifer* (Bloch). *Journal of Fish Diseases*, 40(8), 1089–1101.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Jarungsriapisit, J., Nuñez-Ortiz, N., Nordbø, J., Moore, L. J., Mæhle, S., & Patel, S. (2020). The effect of temperature on the survival of salmonid alphavirus analyzed using in vitro and in vivo methods. *Aquaculture*, 516(November 2019), 734647

Jia, R., Han, C., Lei, J. L., Liu, B. L., Huang, B., Huo, H. H., & Yin, S. T. (2015). Effects of nitrite exposure on haematological parameters, oxidative stress and apoptosis in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquatic Toxicology*, 169, 1–9.

Jia, R., Liu, B. L., Han, C., Huang, B., & Lei, J. L. (2016). The physiological performance and immune response of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*) to nitrite exposure. *Comparative Biochemistry and Physiology* Part C, 181–182, 40–46.

Johansen, R, Sommerset, I., Tørud, B., Korsnes, K., Hjortaas, M. J., & Nilsen, F. (2004). Characterization of nodavirus and viral encephalopathy and retinopathy in farmed turbot, *Scophthalmus maximus* (L.). *Journal of Fish Diseases*, 27, 591-601.

Johansen, R., Ranheim, T., Hansen, M. K., Taksdal, T., & Totland, G. K. (2002). Pathological changes in juvenile Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* persistently infected with nodavirus. *Diseases of Aquatic Organisms*, 50(3), 161-169.

Johnson, K. L., Price, B. D., & Ball, L. A. (2003). Recovery of infectivity from cDNA clones of Nodamura virus and identification of small nonstructural proteins. *Virology*, 305(2), 436-451.

Johnstone, C., Pérez, M., Arizcun, M., García-Ruiz, C., & Chaves-Pozo, E. (2022). Reservoirs of Red-Spotted Grouper Nervous Necrosis Virus (RGNNV) in Squid and Shrimp Species of Northern Alboran Sea. *Viruses*, 14(2).

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.

Kai, Y. H., Su, H. M., Tai, K. T., & Chi, S. C. (2010). Vaccination of grouper broodfish (*Epinephelus tukula*) reduces the risk of vertical transmission by nervous necrosis virus. *Vaccine*, 28(4), 996-1001.

Kamei, Y., Yoshimizu, M., Ezura, Y., & Kimura, T. (1988). Screening of Bacteria with Antiviral Activity from Fresh Water Salmonid Hatcheries. *Microbiology and Immunology*, 32(1), 67–73.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Kagawa, N., Ryo, K., & Mugiya, Y. (1999). Enhanced expression of stress protein 70 in the brains of goldfish, *Carassius auratus*, reared with bluegills, *Lepomis macrochirus*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 21(2), 103–110.

Kagawa, N., & Mugiya, Y. (2002). Brain HSP70 mRNA Expression is Linked with Plasma Cortisol Levels in Goldfish (*Carassius auratus*) Exposed to a Potential Predator. *Fish Physiology and Biochemistry*, 19(2), 735–740.

Kaplan M, Pekmez K, Cagirgan AA, Arslan F, Özkan B, Kalaycı G. (2022) The first detection of betanodavirus reassortant genotype (RGNNV/SJNNV) isolated from gilthead sea bream (*Sparus aurata*) in the Turkish coastlines: The importance of screening and monitoring studies for identifying the source of the infection. *Journal of Fish Diseases*. Jun;45(6):783-793.

Keawcharoen, J., Techangamsuwan, S., Ponpornpisit, A., Lombardini, E. D., Patchimasiri, T., & Pirarat, N. (2015). Genetic characterization of a betanodavirus isolated from a clinical disease outbreak in farm-raised tilapia *Oreochromis niloticus* (L.) in Thailand. *Journal of Fish Diseases*, 38(1), 49-54.

Kim, J. H., Dahms, H. U., & Han, K. N. (2013). Biomonitoring of the river pufferfish, *Takifugu obscurus* in aquaculture at different rearing densities using stress-related genes. *Aquaculture Research*, 44(12), 1835–1846.

Kim, J. H, Kim, S. K., & Hur, Y. B. (2020). Toxic effects of waterborne nitrite exposure on antioxidant responses, acetylcholinesterase inhibition, and immune responses in olive flounders, *Paralichthys olivaceus*, reared in bio-floc and seawater. *Fish and Shellfish Immunology*, 97(November 2019), 581-586.

Kim, J. O., Kim, S. J., Kim, J. O., Kim, W. S., & Oh, M. J. (2018a). Distribution of nervous necrosis virus (NNV) in infected sevenband grouper, *Hyporthodus septemfasciatus* by intramuscular injection or immersion challenge. *Aquaculture*, 489(July 2017), 1-8.

Kim, S. W., Kim, S. J., & Oh, M. J. (2021c). Efficacy of live NNV immersion vaccine immunized at low temperature in sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus*. *Virus Research*, 292(August 2020), 198227.

Kim, Y. C., Kwon, W. J., Kim, M. S., Kim, K. I., Min, J. G., & Jeong, H. D. (2018b). High prevalence of betanodavirus barfin flounder nervous necrosis virus as well as red-spotted grouper nervous necrosis virus genotype in shellfish. *Journal of Fish Diseases*, 41(2), 233–246.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Kim, Y. C., Kwon, W. J., Min, J. G., & Jeong, H. D. (2018c). Isolation and initial characterization of new betanodaviruses in shellfish. *Transboundary and Emerging Diseases*, 65(6), 1557-1567.

Kim, Y. C., Kwon, W. J., Min, J. G., Kim, K. Il, & Jeong, H. Do. (2019). Complete genome sequence and pathogenic analysis of a new betanodavirus isolated from shellfish. *Journal of Fish Diseases*, 42(4), 519-531.

Kim, Y. C., Min, J. G., Kim, K. Il, & Jeong, H. Do. (2021b). Emergence of reassortment between a new and reported types of betanodavirus in shellfish. *Pathogens*, 10(10), 1-15.

Kim, Y. C., & Jeong, H. Do. (2021a). Pathogenicity of new reassortant betanodaviruses to various juvenile fishes. *Journal of fish pathology*, 34, 133-140.

Kiørboe, T. (2011). How zooplankton feed: Mechanisms, traits and trade-offs. *Biological Reviews*, 86(2), 311–339.

Korsnes, K., Karlsbakk, E., Devold, M., Nerland, A. H., & Nylund, A. (2009). Tissue tropism of nervous necrosis virus (NNV) in atlantic cod, *Gadus morhua* L., after intraperitoneal challenge with a virus isolate from diseased Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* (L.). *Journal of Fish Diseases*, 32(8), 655-665.

Korsnes, K., Karlsbakk, E., Nylund, A., & Nerland, A. H. (2012). Horizontal transmission of nervous necrosis virus between turbot *Scophthalmus maximus* and Atlantic cod *Gadus morhua* using cohabitation challenge. *Diseases of Aquatic Organisms*, 99(1), 13-21.

Korsnes, K., Karlsbakk, E., Skår, C. K., Sælemyr, L., Nylund, A., Kvamme, B. O., & Mortensen, S. (2017). High nervous necrosis virus (NNV) diversity in wild wrasse (*Labridae*) in Norway and Sweden. *Diseases of Aquatic Organisms*, 126(1).

Kotikova E, Raikova O, Reuter M, Gustafsson M. (2005). Rotifer nervous system visualized by FMRFamide and 5-HT immunocytochemistry and confocal laser scanning microscopy. *Hydrobiologia*. 2005, 546:239–48

Krishnan, R., Jang, Y. S., & Oh, M. J. (2022). Beta glucan induced immune priming protects against nervous necrosis virus infection in sevenband grouper. *Fish and Shellfish Immunology*, 121(November 2021), 163-171.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Krishnan, R., Kim, J. O., Qadiri, S. S. N., Kim, J. O., & Oh, M. J. (2020). Early viral uptake and host-associated immune response in the tissues of seven-band grouper following a bath challenge with nervous necrosis virus. *Fish and Shellfish Immunology*, 103(May), 454-463.

Krishnan, R., Qadiri, S. S. N., Kim, J. O., & Oh, M. J. (2021). Infection dynamics and shedding kinetics of nervous necrosis virus in juvenile seven band grouper using an intraperitoneal infection-cohabitation model. *Aquaculture*, 530(September 2020), 735957.

Krishnan, R., Qadiri, S. S. N., & Oh, M. J. (2019). Functional characterization of seven-band grouper immunoglobulin like cell adhesion molecule, Nectin4 as a cellular receptor for nervous necrosis virus. *Fish and Shellfish Immunology*, 93(August), 720-725.

Kristiansen, T. S., Fernö, A., Pavlidis, M. A., & Vis, H. van de (Eds.). (2020). The welfare of fish. Springer Nature. Switzerland.

Krkošek, M. (2010). Host density thresholds and disease control for fisheries and aquaculture. *Aquaculture Environment Interactions*, 1(1), 21-32.

Kuchler, R. J. (1977). Biochemical methods in cell culture and virology. *The quarterly review of biology*, 53, 2, 159-160.

Kudoh, T., & Yamaoka, K. (2004). Territorial behavior in juvenile red sea bream *Pagrus major* and crimson sea bream *Evynnis japonica*. *Fisheries Science*, 70(2), 241–246.

Kuo, H. C., Wang, T. Y., Hsu, H. H., Chen, P. P., Lee, S. H., Chen, Y. M., Tsai, T-J., Wang, C-K., Ku, H-T., Lee, G-B., & Chen, T. Y. (2012). Nervous necrosis virus replicates following the embryo development and dual infection with iridovirus at juvenile stage in grouper. *PLoS ONE*, 7, 4, e36183.

Labella, A. M., Garcia-Rosado, E., Bandín, I., Dopazo, C. P., Castro, D., Carmen Alonso, M., & Borrego, J. J. (2018). Transcriptomic profiles of Senegalese sole infected with nervous necrosis virus reassortants presenting different degree of virulence. *Frontiers in Immunology*, 9, 1-12.

Lai, Y. X., Jin, B. L., Xu, Y., Huang, L. jie, Huang, R. Q., Zhang, Y., Kwang, J., He, J-G., & Xie, J. F. (2014). Immune responses of orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*, against virus-like particles of betanodavirus produced in Escherichia coli. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 157(1-2), 87-96.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Lama, R., Pereiro, P., Valenzuela-Muñoz, V., Gallardo-Escárate, C., Tort, L., Figueras, A., & Novoa, B. (2020). RNA-Seq analysis of European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) infected with nodavirus reveals powerful modulation of the stress response. *Veterinary Research*, 51(1), 1–22.

Lampou, E., Dovas, C., Margaroni, M., Chasalevris, T., Pappas, I.S., Dotsika, E., Karagouni, E., Agthanassopoulou, F., Katsaras, D., Bitchava, K. (2020). Investigation of routes of entry and dispersal pattern of RGNNV in tissues of European sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Journal of Fish Diseases*. 2020;43(11):1363–71.

Lane, D.J. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. In *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*, 115-175. Edited by: Stackebrandt, E., Goodfelow, M. Wiley, New York.

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.

Lee, K. W., Chi, S. C., & Cheng, T. M. (2002). Interference of the life cycle of fish nodavirus with fish retrovirus. *Journal of General Virology*, 83(10), 2469-2474.

Leiva-Rebollo, R., Labella, A. M., Valverde, E. J., Castro, D., & Borrego, J. J. (2020). Persistence of Lymphocystis Disease Virus (LCDV) in Seawater. *Food and Environmental Virology*, 12, 174–179.

Lemos, C. H. da P., Ribeiro, C. V. D. M., de Oliveira, C. P. B., Couto, R. D., & Copatti, C. E. (2018). Effects of interaction between pH and stocking density on the growth, haematological and biochemical responses of Nile tilapia juveniles. *Aquaculture*, 495(December 2017), 62–67.

Li, W., Yu, F., Wang, H., Hong, X., & Lu, L. (2020). Induction of pro-viral grass carp *Ctenopharyngodon idella* Hsp70 instead of Hsc70 during infection of grass carp reovirus. *Fish and Shellfish Immunology*, 98(July 2019), 1024–1029.

Li, Q., Zhang, J., Chen, Y., & Yang, F. (2003). White spot syndrome virus (WSSV) infectivity for Artemia at different developmental stages. *Diseases of Aquatic Organisms*, 57(3), 261–264.

Lin, C. C., Lin, J. H. Y., Chen, M. S., & Yang, H. L. (2007). An oral nervous necrosis virus vaccine that induces protective immunity in larvae of grouper (*Epinephelus coioides*). *Aquaculture*, 268(1-4 SPEC. ISS.), 265-273.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Lin, C. F., Jiang, H. K., Chen, N. C., Wang, T. Y., & Chen, T. Y. (2018). Novel subunit vaccine with linear array epitope protect giant grouper against nervous necrosis virus infection. *Fish and Shellfish Immunology*, 74(November 2017), 551-558.

Lin, J. Y., Hu, G. Bin, Liu, D. H., Li, S., Liu, Q. M., & Zhang, S. C. (2015). Molecular cloning and expression analysis of interferon stimulated gene 15 (ISG15) in turbot, *Scophthalmus maximus*. *Fish and Shellfish Immunology*, 45(2), 895-900.

Lin, K., Zhu, Z., Ge, H., Zheng, L., Huang, Z., & Wu, S. (2016). Immunity to nervous necrosis virus infections of orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) by vaccination with virus-like particles. *Fish and Shellfish Immunology*, 56, 136-143.

Liu, H., Teng, Y., Zheng, X., Wu, Y., Xie, X., He, J., Ye, Y., & Wu, Z. (2012). Complete sequence of a viral nervous necrosis virus (NNV) isolated from red-spotted grouper (*Epinephelus akaara*) in China. *Archives of Virology*, 157(4), 777-782.

Liu, P., Wang, L., Wan, Z. Y., Ye, B. Q., Huang, S., Wong, S. M., & Yue, G. H. (2016a). Mapping QTL for Resistance Against Viral Nervous Necrosis Disease in Asian Seabass. *Marine Biotechnology*, 18(1), 107–116.

Liu, P., Wang, L., Kwang, J., Yue, G. H., & Wong, S. M. (2016b). Transcriptome analysis of genes responding to NNV infection in Asian seabass epithelial cells. *Fish and Shellfish Immunology*, 54, 342–352.

Liu, S., Wang, X., Xu, T. T., Li, X., Du, L., & Zhang, Q. (2018). Vectors and reservoir hosts of covert mortality nodavirus (CMNV) in shrimp ponds. *Journal of Invertebrate Pathology*, 154(September 2017), 29–36.

Liu, W., Hsu, C.-H., Hong, Y.-R., Wu, S.-C., Wang, C.-H., Wu, Y.-M., Chao, C-B., & Lin, C.-S. (2005). Early endocytosis pathways in SSN-1 cells infected by dragon grouper nervous necrosis virus. *Journal of General Virology*, 86(9), 2553-2561.

Liu, W., Hsu, C. H., Chang, C. Y., Chen, H. H., & Lin, C. S. (2006). Immune response against grouper nervous necrosis virus by vaccination of virus-like particles. *Vaccine*, 24(37-39), 6282-6287.

Liu, Y., Wimmer, E., & Paul, A. V. (2009). Cis-acting RNA elements in human and animal plus-strand RNA viruses. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1789(9-10), 495-517.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-ΔΔCT method. *Methods*, 25(4), 402–408.

López-Jimena, B., Alonso, M. C., Thompson, K. D., Adams, A., Infante, C., Castro, D., Borrego, J.J., & García-Rosado, E. (2011). Tissue distribution of Red Spotted Grouper Nervous Necrosis Virus (RGNNV) genome in experimentally infected juvenile European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Veterinary Microbiology*, 154(1-2), 86-95.

López-Jimena, B., Cherif, N., Garcia-Rosado, E., Infante, C., Cano, I., Castro, D., Hammami, S., Borrego, J.J., & Alonso, M. C. (2010). A combined RT-PCR and dot-blot hybridization method reveals the coexistence of SJNNV and RGNNV betanodavirus genotypes in wild meagre (*Argyrosomus regius*). *Journal of Applied Microbiology*, 109(4), 1361-1369.

López-Vázquez, C., Alonso, M.C., Dopazo, C.P., & Bandín, I. (2016). In vivo study of viral haemorrhagic septicaemia virus and infectious pancreatic necrosis virus coexistence in Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Journal of Fish Diseases*, 40, 9, 1129-1139.

Low, C. F., Syarul Nataqain, B., Chee, H. Y., Rozaini, M. Z. H., & Najiah, M. (2017). Betanodavirus: Dissection of the viral life cycle. *Journal of Fish Diseases*, 40, 11, 1489-1496.

Lu, M. W., & Lin, C. S. (2003). Involvement of the terminus of grouper betanodavirus capsid protein in virus-like particle assembly. *Archives of Virology*, 148(2), 345-355.

Lu, T. H., Chen, C. Y., Yang, Y. F., & Liao, C. M. (2020). Modelling the effect of vaccination on transmission dynamics of nervous necrosis virus in grouper larvae *Epinephelus coioides*. *Journal of Fish Diseases*, 43(10), 1155-1165.

Makesh, M., Satyanarayana, N. V., Selvamano, S., Jayaprakash, N.S., Bera, A., Sukumaran, K., Kailasam, M. (2022) Nervous necrosis virus titration and antigen quantitation by indirect sandwich enzyme linked immunosorbent assay. *Journal of Virological Methods*, Volume 305, 2022, 114536.

Mai, W., Liu, H., Chen, H., Zhou, Y., & Chen, Y. (2018). RGNNV-induced cell cycle arrest at G1/S phase enhanced viral replication via p53-dependent pathway in GS cells. *Virus Research*, 256(February), 142-152.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Manin, B. O., & Ransangan, J. (2011). Experimental evidence of horizontal transmission of Betanodavirus in hatchery-produced Asian seabass, *Lates calcarifer* and brown-marbled grouper, *Epinephelus fuscoguttatus* fingerling. *Aquaculture*, 321(1-2), 157-165.

Marcogliese, D. J. (2002). Food webs and the transmission of parasites to marine fish. *Parasitology*, 124(7), 83–99.

Marshall, D., & Schneemann, A. (2001). Specific packaging of nodaviral RNA2 requires the N-terminus of the capsid protein. *Virology*, 285(1), 165-175.

Mekata, T., Satoh, J., Inada, M., Dinesh, S., Harsha, P., Itami, T., & Sudhakaran, R. (2015). Development of simple, rapid and sensitive detection assay for grouper nervous necrosis virus using real-time loop-mediated isothermal amplification. *Journal of Fish Diseases*, 38(10), 873-879.

MeteoGalicia - Consellería de Medio Ambiente, Territorio e Infraestruturas - Xunta de Galicia, Rúa Roma, 6, 15707 Santiago de Compostela. A Coruña. http://www2.meteogalicia.gal/galego/observacion/plataformas/platHistorico.asp?Nest=15005&x=65&y=85 [Fecha acceso: 22/01/2022].

Mézeth, K. B., Nylund, S., Henriksen, H., Patel, S., Nerland, A. H., & Szilvay, A. M. (2007). RNA-dependent RNA polymerase from Atlantic Halibut Nodavirus contains two signals for localization to the mitochondria. *Virus Research*, 130(1-2), 43-52.

Mézeth, K. B., Patel, S., Henriksen, H., Szilvay, A. M., & Nerland, U. H. (2009). B2 protein from betanodavirus is expressed in recently infected but not in chronically infected fish. *Diseases of Aquatic Organisms*, 83(2), 97-103.

Milena, Á., Souto, S., Flórez-Fernández, N., Torres, M. D., Bandín, I., & Domínguez, H. (2021). Antiviral Activity of Carrageenans and Processing Implications. *Marine Drugs*, 19, 437.

Mladineo, I. (2003). The immunohistochemical study of nodavirus changes in larval, juvenile and adult sea bass tissue. *Journal of Applied Ichthyology*, 19(6), 366-370.

Montes, A., Figueras, A., & Novoa, B. (2010). Nodavirus encephalopathy in turbot (*Scophthalmus maximus*): Inflammation, nitric oxide production and effect of anti-inflammatory compounds. *Fish and Shellfish Immunology*, 28(2), 281-288.

Moody, N. J. G., Horwood, P. F., Reynolds, A., Mahony, T. J., Anderson, I. G., & Oakey, H. J. (2009). Phylogenetic analysis of betanodavirus isolates from Australian finfish. *Diseases of Aquatic Organisms*, 87(3), 151-160.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Moreno, P., Lopez-Jimena, B., Randelli, E., Scapigliati, G., Buonocore, F., Garcia-Rosado, E., Borrego, J.J., & Alonso, M. C. (2018). Immuno-related gene transcription and antibody response in nodavirus (RGNNV and SJNNV)-infected European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Fish and Shellfish Immunology*, 78(April), 270-278.

Moreno, P., Olveira, J.G., Labella, A., Cutrín, J.M., Baro, J.C., Borrego, J.J., & Dopazo, C.P. (2014). Surveillance of viruses in wild fish populations in areas around the Gulf of Cadiz (South Atlantic Iberian Peninsula). *Applied and Environmental Microbiology*, 80, 20, 6560-6571.

Moreno, P., Souto, S., Leiva-Rebollo, R., Borrego, J. J., Bandín, I., & Alonso, M. C. (2019). Capsid amino acids at positions 247 and 270 are involved in the virulence of betanodaviruses to European sea bass. *Scientific Reports*, 9(1), 1-11.

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.

Mori, K. I., Nakai, T., Nagahara, M., Muroga, K., Mekuchi, T., & Kanno, T. (1991). A Viral Disease in Hatchery-reared Larvae and Juveniles of Redspotted Grouper. *Fish Pathology*, 26(4), 209-210.

Mori, K., 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, Mushiake, K., & Arimoto, M. (1998). Control Measures for Viral Nervous Necrosis in Striped Jack. *Fish Pathology*, 33(4), 443-444.

Morick, D., & Saragovi, A. (2017). Inhibition of nervous necrosis virus by ribavirin in a zebrafish larvae model. *Fish and Shellfish Immunology*, 60, 537-544.

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

Munday, B. L., Langdsnb, J. S., Hyaw, 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, 197-211.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Nagai, T., & Nishizawa, T. (1999). Sequence of the non-structural protein gene encoded by RNA1 of striped jack nervous necrosis virus. *Journal of General Virology*, 80(11), 3019-3022.

Nakai, T., Dung, N., Nishizawa, T., Muroga, K., Arimoto, M., & K, O. (1994). Occurrence of viral nervous necrosis in kelp grouper and tiger puffer. *Fish Pathology*, 29, 211-212.

Naveen Kumar, S., Karunasagar, I., & Karunasagar, I. (2013). Protection of *Macrobranchium rosembergii* against white tail disease by oral administration of bacterial expressed and encapsulated double-stranded RNA. *Fish and Shellfish Immunology*, 35, 833-839.

Naylor, R. L., Hardy, R. W., Buschmann, A. H., Bush, S. R., Cao, L., Klinger, D. H., Little, D.C., Lubchenco, J., Shumway, S. E., Troell, M. (2021). A 20-year retrospective review of global aquaculture. *Nature*, 591(7851), 551-563.

Nguyen, H. D., Mushiake, K., Nakai, T., & Muroga, K. (1997). Tissue distribution of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) in adult striped jack. *Disease of Aquatic Organisms*, 28, 87-91.

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(2), 99-105.

Nicolas, J., Robic, E., & Ansquer, D. (1989). Bacterial flora associated with a trophic chain consisting of microalgae, rotifers and turbot larvae: influence of bacteria on larval survival. *Aquaculture*, 83, 3-4, 237-248.

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.

Nishizawa, T., Mori, K-i., 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. *Journal of General Virology*, 76(7), 1563-1569.

Nishizawa, T., Mori K-i., Nakai, T., Furusawa, I., & Muroga, K. (1994). Polymerase chain reaction (PCR) amplification of RNA of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV). *Diseases of Aquatic Organisms*, 18(2), 103-107.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Nishizawa, T, Gye, H. J., Takami, I., & Oh, M. J. (2012). Potentiality of a live vaccine with nervous necrosis virus (NNV) for sevenband grouper *Epinephelus septemfasciatus* at a low rearing temperature. *Vaccine*, 30(6), 1056-1063.

Nishizawa, T., Kokawa, Y., Wakayama, T., Kinoshita, S., & Yoshimizu, M. (2008). Enhanced propagation of fish nodaviruses in BF-2 cells persistently infected with snakehead retrovirus (SnRV). *Diseases of Aquatic Organisms*, 79(1), 19-25.

Nishizawa T., Takano, R., & Muroga, K. (1999). Mapping a neutralizing epitope on the coat protein of striped Jack nervous necrosis virus. *Journal of General Virology*, 80, 3023-3027.

Nuñez-Ortiz, N., Stocchi, V., Toffan, A., Pascoli, F., Sood, N., Buonocore, F., Picchietti, S., Papeschi, C., Taddei, A.R., Thompson, K.D., & Scapigliati, G. (2016a). Quantitative immunoenzymatic detection of viral encephalopathy and retinopathy virus (betanodavirus) in sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Journal of Fish Diseases*, 39(7).

Nuñez-Ortiz, Noelia, Pascoli, F., Picchietti, S., Buonocore, F., Bernini, C., Toson, M., Scapigliati, G., & Toffan, A. (2016b). A formalin-inactivated immunogen against viral encephalopathy and retinopathy (VER) disease in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*): Immunological and protection effects. *Veterinary Research*, 47(1), 1-11.

Nylund, A., Karlsbakk, E., Nylund, S., Isaksen, T. E., Karlsen, M., Korsnes, K., handeland, S., Martinsen, R., Pedersen, M., & 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.

Ogut, H., & Reno, P. W. (2004). Effects of fish density on spread of infectious hematopoietic necrosis virus (INHV) in rainbow trout, *Onchorhynchus mykiss*. *The Israeli Journal of Aquaculture*, 563)(January), 218–225.

Oh, M. J., Gye, H. J., & Nishizawa, T. (2013). Assessment of the sevenband grouper *Epinephelus septemfasciatus* with a live nervous necrosis virus (NNV) vaccine at natural seawater temperature. *Vaccine*, 31(16), 2025-2027.

Oidtmann, B., Dixon, P., Way, K., Joiner, C., & Bayley, A. E. (2018). Risk of waterborne virus spread – review of survival of relevant fish and crustacean viruses in the aquatic environment and implications for control measures. *Reviews in Aquaculture*, 10(3), 641–669.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

OIE (2019). Chapter 2.3.12. Viral Encephalopathy and Retinopathy. In *Manual of diagnostic tests for aquatic animals*.

Olveira, J. G., Soares, F., Engrola, S., Dopazo, C. P., & Bandín, I. (2008). Antemortem versus postmortem methods for detection of betanodavirus in Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 20(2), 215-219.

Olveira, J.G., Souto, S., Bandín, I., & Dopazo, C.P. (2021). Development and Validation of a SYBR Green RealTime PCR Protocol for Detection and Quantification of Nervous Necrosis Virus (NNV) Using Different Standards. *Animals*,11, 1100.

Olveira, J. G., Souto, S., Dopazo, C. P., & Bandín, I. (2013). Isolation of betanodavirus from farmed turbot *Psetta maxima* showing no signs of viral encephalopathy and retinopathy. *Aquaculture*, 406-407, 125-130.

Olveira, J. G., Souto, S., Dopazo, C. P., Thiéry, R., Barja, J. L., & Bandín, I. (2009). Comparative analysis of both genomic segments of betanodaviruses isolated from epizootic outbreaks in farmed fish species provides evidence for genetic reassortment. *Journal of General Virology*, 90(12), 2940-2951.

Ou, M. C., Chen, Y. M., Jeng, M. F., Chu, C. J., Yang, H. L., & Chen, T. Y. (2007). Identification of critical residues in nervous necrosis virus B2 for dsRNA-binding and RNAi-inhibiting activity through by bioinformatic analysis and mutagenesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 361(3), 634-640.

Øvergård, A. C., Nerland, A. H., Fiksdal, I. U., & Patel, S. (2012). Atlantic halibut experimentally infected with nodavirus shows increased levels of T-cell marker and IFNγ transcripts. *Developmental and Comparative Immunology*, 37(1), 139-150.

Overstreet, R. M., Stuck, K. C., Krol, R. A., & Hawkins, W. E. (1988). Experimental Infections with Baculovirus penaei in the White Shrimp *Penaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda) as a Bioassay. *Journal of the World Aquaculture Society*, 19(4), 175–187.

Padrós, F., Caggiano, M., Toffan, A., Constenla, M., Zarza, C., & Ciulli, S. (2022). Integrated Management Strategies for Viral Nervous Necrosis (VNN) Disease Control in Marine Fish Farming in the Mediterranean. *Pathogens*, 11, 330.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

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 and Shellfish Immunology*, 28(4), 525-533.

Pakingking, R., de Jesus-Ayson, E. G., Reyes, O., & Brian Bautista, N. (2018). Immunization regimen in Asian sea bass (*Lates calcarifer*) broodfish: A practical strategy to control vertical transmission of nervous necrosis virus during seed production. *Vaccine*, 36(33), 5002-5009.

Panzarin, V., Cappellozza, E., Mancin, M., Milani, A., Toffan, A., Terregino, C., & Cattoli, G. (2014). In vitro study of the replication capacity of the RGNNV and the SJNNV betanodavirus genotypes and their natural reassortants in response to temperature. *Veterinary Research*, 45(1), 1-11.

Panzarin, V., Fusaro, A., Monne, I., Cappellozza, E., Patarnello, P., Bovo, G., Capua, I., Holmes, E.C., & Cattoli, G. (2012). Molecular epidemiology and evolutionary dynamics of betanodavirus in southern Europe. *Infection, Genetics and Evolution*, 12(1), 63-70.

Panzarin, V., Patarnello, P., Mori, A., Rampazzo, E., Cappellozza, E., Bovo, G., & Cattoli, G. (2010). Development and validation of a real-time TaqMan PCR assay for the detection of betanodavirus in clinical specimens. *Archives of Virology*, 155(8), 1193-1203.

Panzarin, V., Toffan, A., Abbadi, M., Buratin, A., Mancin, M., Braaen, S., Olsen, C.M., Bargelloni, L., Rimstad, E., & Cattoli, G. (2016). Molecular basis for antigenic diversity of genus Betanodavirus. *PLoS O*NE, 11(7).

Park, J., Daniels, H. V., & Cho, S. H. (2013). Nitrite toxicity and methemoglobin changes in southern flounder, *Paralichthys lethostigma*, in brackish water. *Journal of the World Aquaculture Society*, 44(5), 726–734.

Pascoli, F., Guazzo, A., Buratin, A., Toson, M., Buonocore, F., Scapigliati, G., & Toffan, A. (2019). Lack of in vivo cross-protection of two different betanodavirus species RGNNV and SJNNV in European sea bass *Dicentrachus labrax*. *Fish and Shellfish Immunology*, 85(October), 85-89.

Pascoli, F., Serra, M., Toson, M., Pretto, T., & Toffan, A. (2016). Betanodavirus ability to infect juvenile European sea bass, *Dicentrarchus labrax*, at different water salinity. *Journal of Fish Diseases*, 39(9), 1061-1068.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Péducasse, S., Castric, J., Thiéry, 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(1), 11-20.

Perry, A. K., Chen, G., Zheng, D., Tang, H., & Cheng, G. (2005). The host type I interferon response to viral and bacterial infections. *Cell Research*, 15(6), 407-422.

Pockley, G. (2003). Heat shock proteins as chaperones of the immune response. *Lancet*, 362, 469–476

Pinon, A., & Vialette, M. (2019). Survival of viruses in water. *Intervirology*, 61(5), 214–222.

Poisa-Beiro, L., Dios, S., Ahmed, H., Vasta, G. R., Martínez-López, A., Estepa, A., Alonso-Gutiérrez, J., Figueras, A., & Novoa, B. (2009). Nodavirus Infection of Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*) Induces Up-Regulation of Galectin-1 Expression with Potential Anti-Inflammatory Activity. *The Journal of Immunology*, 183(10), 6600-6611.

Poisa-Beiro, L., Dios, S., Montes, A., Aranguren, R., Figueras, A., & Novoa, B. (2008). Nodavirus increases the expression of Mx and inflammatory cytokines in fish brain. *Molecular Immunology*, 45(1), 218-225.

Randall, D. J., & Tsui, T. (2002). Ammonia toxicity in fish. *Marine Pollution Bulletin*, 45, 17–23.

Real Decreto 526/2014. Boletín Oficial del Estado. Lista de las enfermedades de los animales de declaración obligatoria.

Reed, L. J., & Muench, H. (1938). A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *The American Journal of Hygiene*, 27, 493–497.

Renault, T., Haffner, P., Laurencin, F., Breuil, G., & Bonami, J. (1991). Mass mortalities in hatchery-reared sea bass (*Lates calcarifer*) larvae associated with the presence in the brain and retina of virus-like particles. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* (EAFP), 11(2), 68-73.

Robertsen, B. (2006). The interferon system of teleost fish. F*ish and Shellfish Immunology*, 20(2), 172-191.

Rodgers, C. J., Mohan, C. V., & Peeler, E. J. (2011). The spread of pathogens through trade in aquatic animals and their products. *OIE Revue Scientifique et Technique*, 30(1), 241–256.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Rule W.K., Menin, L., Montoya, J. P., & Kohn, T. (2010). Oxidation of virus proteins during UV254 and singlet oxygen mediated inactivation. *Environmental Science and Technology*, 44(14), 5437–5443.

Salas-Leiton, E., Anguis, V., Martín-Antonio, B., Crespo, D., Planas, J. V., Infante, C., Cañavate, J. P., & Manchado, M. (2010). Effects of stocking density and feed ration on growth and gene expression in the Senegalese sole (*Solea senegalensis*): Potential effects on the immune response. *Fish and Shellfish Immunology*, 28(2), 296–302

Salonen, A., Ahola, T., & Kääriäinen, L. (2004). Viral RNA replication in association with cellular membranes. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 285, 139–173.

Samaras, A., Santo, C. E., Papandroulakis, N., Mitrizakis, N., Pavlidis, M., Höglund, E., Pelgrim, T. N. M., Zethol, J., Tom Spanings, F. A., Vindas, M. A., Ebbeson, L. O. E., Flik, G., & Gorissen, M. (2018). Allostatic load and stress physiology in European seabass (*Dicentrarchus labrax* L.) and gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Frontiers in Endocrinology*, 9(AUG), 1–13.

Samat, N. A., Yusoff, F. M., Rasdi, N. W., & Karim, M. (2020). Enhancement of live food nutritional status with essential nutrients for improving aquatic animal health: A review. *Animals*, 10(12), 1-27.

Sammouth, S., d'Orbcastel, E. R., Gasset, E., Lemarié, G., Breuil, G., Marino, G., Coeurdacier, J-L., Fivelstad, S., & Blancheton, J. P. (2009). The effect of density on sea bass (*Dicentrarchus labrax*) performance in a tank-based recirculating system. *Aquacultural Engineering*, 40(2), 72–78.

Sánchez, P., Ambrosio, P. P., & Flos, R. (2010). Stocking density and sex influence individual growth of Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Aquaculture*, 300(1–4), 93–101.

Scapigliati, G., Romano, N., Buonocore, F., Picchietti, S., Baldassini, M.R., Prugnoli, D., Galice, A., Meloni, S., Secombes, C. J., Mazzini, & M., Abelli, L. (2002). The immune system of sea bass, *Dicentrarchus labrax*, reared in aquaculture. *Developmental and Comparative Immunology,* 26(2):151–60.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Scapigliati, G., Buonocore, F., Randelli, E., Casani, D., Meloni, S., Zarletti, G., Tiberi, M., Pietretti, D., Boschi, I., Manchado, M., Martin-Antonio, B., Jimenez-Cantizano, R., Bovo, G., Borghesan, F., Lorenzen, N., Einer-Jensen, K., Adams, S., Thompson, K., Alonso, M. C., Béjar, J., Cano, I., Borrego, J. J., & Alvarez, M. C. (2010). Cellular and molecular immune responses of the sea bass (*Dicentrarchus labrax*) experimentally infected with betanodavirus. *Fish and Shellfish Immunology*, 28(2), 303-311.

Schwedler, T. E., & Plumb, J. A. (1982). Golden shiner virus: Effects of stocking density on incidence of viral infection. *Progressive Fish-Culturist*, 44(3), 151–152.

Senapin, S., Molthathong, S., Phiwsaiya, K., Jaengsanong, C., & Chuchird, N. (2010). Application of high-resolution melt (HRM) analysis for duplex detection of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (MrNV) and extra small virus (XSV) in shrimp. *Molecular and Cellular Probes*, 24(5), 291-297.

Shetty, M., Maiti, B., Shivakumar Santhosh, K., Venugopal, M. N., & Karunasagar, I. (2012). Betanodavirus of marine and freshwater fish: Distribution, genomic organization, diagnosis and control measures. *Indian Journal of Virology*, 23(2), 114-123.

Shieh, J. R., & Chi, S. C. (2005). Production of monoclonal antibodies against grouper nervous necrosis virus (GNNV) and development of an antigen capture ELISA. *Diseases of Aquatic Organisms*, 63(1), 53-60.

Shimizu, T., Yoshida, N., Kasai, H., & Yoshimizu, M. (2006). Survival of koi herpesvirus (KHV) in environmental water. *Fish Pathology*, 41(4), 153–157.

Sirikharin, R., Utairungsee, T., Srisala, J., Roytrankul, S., Thitamadee, S., & Sritunyalucksana, K. (2019). Cell surface transglutaminase required for nodavirus entry into freshwater prawn hemocytes. *Fish and Shellfish Immunology*, 89, 108-116.

Sivakumar, V. K., Sarathi, M., Venkatesan, C., Sivaraj, A., & Hameed, A. S. S. (2009). Experimental exposure of Artemia to Hepatopancreatic parvo-like Virus and Subsequent transmission to post-larvae of Penaeus monodon. *Journal of Invertebrate Pathology*, 102(3), 191–195.

Skliris, G. P., & Richards, R. H. (1998). Assessment of the susceptibility of the brine shrimp *Artemia salina* and rotifer *Brachionus plicatilis* to experimental nodavirus infections. *Aquaculture*, 169(1–2), 133–141.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Skliris, G. P., & Richards, R. H. (1999). Induction of nodavirus disease in seabass, *Dicentrarchus labrax*, using different infection models. *Virus Research*, 63(1-2), 85-93.

Sommerset, I., & Nerland, A. H. (2004). Complete sequence of RNA1 and subgenomic RNA3 of Atlantic halibut nodavirus (AHNV). *International Journal of Urology*, 58, 117-125.

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.

Sopinka, N. M., Donaldson, M. R., O'Connor, C. M., Suski, C. D., & Cooke, S. J. (2016). Stress Indicators in Fish. *In Fish Physiology (Vol. 35). Elsevier Inc.*

Souto, S., López-Jimena, B., Alonso, M. C., García-Rosado, E., & Bandín, I. (2015a). Experimental susceptibility of European sea bass and Senegalese sole to different betanodavirus isolates. *Veterinary Microbiology*, 177(1-2), 53-61.

Souto, S., Mérour, E., Biacchesi, S., Olveira, J. G., Brémont, M., & Bandín, I. (2015b). In vitro and in vivo characterization of molecular determinants of virulence in reassortant betanodavirus. *Journal of General Virology*, 96(6), 1287-1296.

Souto, S., Olveira, J. G., Alonso, M. C., Dopazo, C. P., & Bandín, I. (2018a). Betanodavirus infection in bath-challenged Solea senegalensis juveniles: A comparative analysis of RGNNV, SJNNV and reassortant strains. *Journal of Fish Diseases*, 00, 1-8.

Souto, S., Olveira, J.G., Bandín, I. (2015c). Influence of temperature on Betanodavirus infection in Senegalese sole (*Solea senegalensis*), *Veterinary Microbiology*, 179, (3–4), 162-167.

Souto, S., Olveira, J. G., Dopazo, C. P., & Bandín, I. (2016). Reassortant betanodavirus infection in turbot (*Scophthalmus maximus*). *Journal of fish diseases*, 39(11), 1347-1356.

Souto, S., Olveira, J. G., Dopazo, C. P., Borrego, J. J., & Bandín, I. (2018b). Modification of betanodavirus virulence by substitutions in the 3' terminal region of RNA2. *Journal of General Virology*, 99(9), 1210-1220.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Souto, S., Olveira, J. G., García-Rosado, E., Dopazo, C. P., & Bandín, I. (2019). Amino acid changes in the capsid protein of a reassortant betanodavirus strain: Effect on viral replication in vitro and in vivo. *Journal of Fish Diseases*, 42(2), 221–227.

Souto, S., Olveira, J. G., Vázquez-Salgado, L., Dopazo, C. P., & Bandín, I. (2018c). Betanodavirus infection in primary neuron cultures from sole. *Veterinary Research*, 49(1), 12-15.

Stappen, G. V. (1996). Introduction , biology and ecology of Artemia. Manual on the production and use of live food for aquaculture. In *FAO Fisheries Technical Paper* 361, 79-106.

Starkey, W. G., Ireland, J. H., Muir, K. F., Jenkins, M. E., Roy, W. J., Richards, R. H., & Ferguson, H. W. (2001). Nodavirus infection in Atlantic cod and Dover sole in the UK. *Veterinary Record*, 149(6), 179-181.

Starkey, W. G., Ireland, J. H., Muir, K. F., Shinn, A. P., Richards, R. H., & Ferguson, H. W. (2000). Isolation of nodavirus from Scottish farmed halibut, *Hippoglossus hippoglossus* (L). *Journal of Fish Diseases*, 23(6), 419-422.

Starkey, W. G., Millar, R. M., Jenkins, M. E., Ireland, J. H., Muir, K. F., & Richards, R. H. (2004). Detection of piscine nodaviruses by real-time nucleic acid sequence-based amplification (NASBA). *Diseases of Aquatic Organisms*, 59(2), 93-100.

Stickney R.R. (2013). Polyculture in Aquaculture. In *Sustainable Food Production*. Edited by Christou, P., Savin, R., Costa-Pierce, B.A., Misztal, I., Whitelaw, C.B.A. Springer, New York.

Su, Y. C., Chiu, H. W., Hung, J. C., & Hong, J. R. (2014). Beta-nodavirus B2 protein induces hydrogen peroxide production, leading to Drp1-recruited mitochondrial fragmentation and cell death via mitochondrial targeting. *Apoptosis*, 19(10), 1457-1470.

Su, Y. C., Reshi, L., Chen, L. J., Li, W. H., Chiu, H. W., & Hong, J. R. (2018). Nuclear targeting of the betanodavirus B1 protein via two arginine-rich domains induces G1/S cell cycle arrest mediated by upregulation of p53/p21. *Scientific Reports*, 8(1), 1-12.

Su, Y. C., Wu, J. L., & Hong, J. R. (2011). Betanodavirus up-regulates chaperone GRP78 via ER stress: Roles of GRP78 in viral replication and host mitochondria-mediated cell death. *Apoptosis*, 16(3), 272-287.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Su, Y. C, & Hong, J. R. (2010). Betanodavirus B2 causes ATP depletion-induced cell death via mitochondrial targeting and complex II inhibition in vitro and in vivo. *Journal of Biological Chemistry*, 285(51), 39801-39810.

Su, Z. D., Shi, C. Y., Huang, J., Shen, G. M., Li, J., Wang, S. Q., & Fan, C. (2015). Establishment and application of cross-priming isothermal amplification coupled with lateral flow dipstick (CPA-LFD) for rapid and specific detection of red-spotted grouper nervous necrosis virus. *Virology Journal*, 12(1), 1-8.

Sudhakaran, R., Ishaq Ahmed, V. P., Haribabu, P., Mukherjee, S. C., Sri Widada, J., Bonami, J. R., & Sahul Hameed, A. S. (2007). Experimental vertical transmission of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (MrNV) and extra small virus (XSV) from brooders to progeny in *Macrobrachium rosenbergii* and Artemia. *Journal of Fish Diseases*, 30(1), 27–35.

Sudhakaran, R., Yoganandhan, K., Ishaq Ahmed, V. P., & Sahul Hameed, A. S. (2006). Artemia as a possible vector for *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (MrNV) and extra small virus transmission (XSV) to *Macrobrachium rosenbergii* post-larvae. *Diseases of Aquatic Organisms*, 70(1–2), 161–166.

Sushila, N., Hameed, A. S. S., Prasad, K. P., Majeed, S. A., & Tripathi, G. (2018). In vitro screening of selected antiviral drugs against betanodavirus. *Journal of Virological Methods*, 259(June), 66-73.

Tan, C., Huang, B., Chang, S. F., Ngoh, G. H., Munday, B., Chen, S. C., & Kwang, J. (2001). Determination of the complete nucleotide sequences of RNA1 and RNA2 from greasy grouper. *Journal of General Virology*, 82, 647-653.

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.

Tanaka, S., Takagi, M., & Miyazaki, T. (2004). Histopathological studies on viral nervous necrosis of sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus* Thunberg, at the grow-out stage. *Journal of Fish Diseases*, 27(7), 385-399.

Tanaka, S., Aoki, H., & Nakai, T. (1998). Pathogenicity of the nodavirus detected from diseased sevenband grouper *Epinephelus septemfasciatus*. *Fish Pathology*, 33(1), 31-36.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tang, L., Lin, C., Krishna, N. K., Yeager, M., Schneemann, A., & Johnson, J. E. (2002). Virus-Like Particles of a Fish Nodavirus Display a Capsid Subunit Domain Organization Different from That of Insect Nodaviruses. *Journal of Virology*, 76(12), 6370-6375.

Tarrab, K., Ravid-peretz, S., & Ucko, M. (2019). Immunoserology of European seabass (*Dicentrarchus labrax*) and white grouper (*Epinephelus aeneus*) as a non-lethal diagnostic tool for viral nervous necrosis. *Aquaculture International*, 27, 63-77.

Teng, Y. F., Xu, L., Wei, M. Y., Wang, C. Y., Gu, Y. C., & Shao, C. L. (2020). Recent progresses in marine microbial-derived antiviral natural products. *Archives of Pharmacal Research*, 43(12), 1215–1229.

Terova, G., Gornati, R., Rimoldi, S., Bernardini, G., & Saroglia, M. (2005). Quantification of a glucocorticoid receptor in sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) reared at high stocking density. *Gene*, 357(2), 144–151.

Thiéry, R., Cozien, J., de Boisséson, C., Kerbart-Boscher, S. & Névarez, L. (2004). Genomic classification of new betanodavirus isolates by phylogenetic analysis of the coat protein gene suggests a low host-fish species specificity. *Journal of General Virology,* 85, 3079–3087.

Thiéry, R., Arnauld, C. & Delsert, C. (1999). Two isolates of sea bass, *Dicentrarchus labrax* L., nervous necrosis virus with distinct genomes. *Journal of Fish Diseases*, 22, 201–207.

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.

Thiery, R., Johnson, K., Nakai, T., Schneemann, A., Bonami, J., & Lightner, D. (2011). Virus Taxonomy. In*: Ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Edited by King, A. M. Q., Adams, A., & Lefkowitz, E. J. Elsevier Academic Press.

Toffan, A, & Panzarin, V. (2020). 6. Viral Encephalopathy and Retinopathy / Viral Nervous Necrosis (VER /VNN). Diagnostic Manual for the main pathogens in European seabass and Gilthead seabream aquaculture, 60, 45-60.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Toffan, A., Biasini, L., Pretto, T., Abbadi, M., Buratin, A., Franch, R., Dalla Rovere, G., Panzarin, V., Marsella, A., Bargelloni, L., & Pascoli, F. (2021). Age dependency of RGNNV/SJNNV viral encephalo-retinopathy in Gilthead Sea Bream (Sparus aurata). *Aquaculture*, 539, 736605.

Toffan, A, Pascoli, F., Pretto, T., Panzarin, V., Abbadi, M., Buratin, A., Quartesan, R., Gijón, D., & Padros, F. (2017). Viral nervous necrosis in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) caused by reassortant betanodavirus RGNNV/SJNNV: An emerging threat for Mediterranean aquaculture. *Scientific Reports*, 7(March), 1-12.

Toffolo, V., Negrisolo, E., Maltese, C., Bovo, G., Belvedere, P., Colombo, L., & Dalla Valle, L. (2007). Phylogeny of betanodaviruses and molecular evolution of their RNA polymerase and coat proteins. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 43(1), 298-308.

Toranzo, A. E., Barja, J. L., & Hetrick, F. M. (1983). Mechanism of poliovirus inactivation by cell-free filtrates of marine bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, 29(11), 1481–1486.

Tort, L. (2011). Stress and immune modulation in fish. *Developmental and Comparative Immunology*, 35(12), 1366–1375.

Tort, L., Narayan, E. J., & Cockrem, J. F. (2019). Comparative endocrine stress responses in vertebrates. In *Frontiers in Endocrinology*. Edited by: Tort, L., Narayan, E. J., & Cockrem, J. F. Lausanne: Frontiers Media SA.

Totland, G. K., Grotmol, S., Morita, Y., Nishioka, T., & Nakai, T. (1999). Pathogenicity of nodavirus strains from striped jack *Pseudocaranx dentex* and Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus*, studied by waterborne challenge of yolk-sac larvae of both teleost species. *Diseases of Aquatic Organisms*, 38(3), 169-175.

Toubanaki, D. K., Efstathiou, A., & Karagouni, E. (2022). Transcriptomic Analysis of Fish Hosts Responses to Nervous Necrosis Virus. *Pathogens*, 11(2).

Toubanaki, D. K., & Karagouni, E. (2017). Genotype-specific real-time PCR combined with high-resolution melting analysis for rapid identification of red-spotted grouper nervous necrosis virus. *Archives of Virology*, 162(8), 2315-2328.

Toubanaki, D. K., Margaroni, M., & Karagouni, E. (2015). Nanoparticle-based lateral flow biosensor for visual detection of fish nervous necrosis virus amplification products. *Molecular and Cellular Probes*, 29(3), 158-166.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Toubanaki, D. K., Margaroni, M., Prapas, A., & Karagouni, E. (2020). Development of a Nanoparticle-based Lateral Flow Strip Biosensor for Visual Detection of Whole Nervous Necrosis Virus Particles. *Scientific Reports*, 10(1), 1-12.

Toubanaki, D., & Karagouni, E. (2020). Paper Lateral Flow Biosensor for Nodavirus Reverse Transcribed RNA Detection. *Scientific Reports,* 10(15), 1-13.

Tsai, Y. L., Tran, B., & Palmer, C. J. (1995). Analysis of viral RNA persistence in seawater by reverse transcriptase- PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(1), 363–366.

Turgay, E., Steinum, T. M., Eryalçın, K. M., Yardımcı, R. E., & Karataş, S. (2020). The influence of diet on the microbiota of live-feed rotifers (*Brachionus plicatilis*) used in commercial fish larviculture. *FEMS Microbiology Letters*, 367(2).

Unchwaniwala, N., Zhan, H., den Boon, J. A., & Ahlquist, P. (2021). Cryo-electron microscopy of nodavirus RNA replication organelles illuminates positive-strand RNA virus genome replication. *Current Opinion in Virology*, 51, 74–79.

Valenzuela, C. A., Ponce, C., Zuloaga, R., González, P., Avendaño-Herrera, R., Valdés, J. A., & Molina, A. (2020). Effects of crowding on the three main proteolytic mechanisms of skeletal muscle in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *BMC Veterinary Research*, 16(1), 1–12.

Valero, Y., Arizcun, M., Esteban, M. Á., Bandín, I., Olveira, J. G., Patel, S., Cuesta, A., & Chaves-Pozo, E. (2015). Nodavirus Colonizes and Replicates in the Testis of Gilthead Seabream and European Sea Bass Modulating Its Immune and Reproductive Functions. *PLoS ONE*, 10(12), 1-24.

Valero, Y., Awad, E., Buonocore, F., Arizcun, M., Esteban, M. Á., Meseguer, J., Chaves-Pozo, E., & Cuesta, A. (2016). An oral chitosan DNA vaccine against nodavirus improves transcription of cell-mediated cytotoxicity and interferon genes in the European sea bass juveniles gut and survival upon infection. *Developmental and Comparative Immunology*, 65, 64-72.

Valero, Y., López-Vázquez, C., Souto, S., Olveira, J. G., Cuesta, A., & Bandín, I. (2021a). Differential nervous necrosis virus (NNV) replication in five putative susceptible cell lines. *Pathogens*, 10(12), 1565-1579.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Valero, Y., Mokrani, D., Chaves-Pozo, E., Arizcun, M., Oumouna, M., Meseguer, J., Esteban, M. A., & Cuesta, A. (2018). Vaccination with UV-inactivated nodavirus partly protects European sea bass against infection, while inducing few changes in immunity. Dev*elopmental and Comparative Immunology*, 86, 171-179.

Valero, Y., Olveira, J. G., López-Vázquez, C., Dopazo, C. P., & Bandín, I. (2021b). Bei inactivated vaccine induces innate and adaptive responses and elicits partial protection upon reassortant betanodavirus infection in Senegalese sole. *Vaccines*, 9(5).

Valverde, E. J., Labella, A. M., Borrego, J. J., & Castro, D. (2019). *Artemia* spp., a susceptible host and vector for lymphocystis disease virus. *Viruses*, 11(6).

Vaz, M., Pires, D., Pires, P., Simões, M., Pombo, A., Santos, P., do Carmo, B., Passos, R., Costa, J.Z., Thompson, K.D., Baptista, T. (2022). Early Immune Modulation in European Seabass (*Dicentrarchus labrax*) Juveniles in Response to Betanodavirus Infection. *Fishes*, 7, 63.

Vendramin, N., Toffan, A., Mancin, M., Cappellozza, E., Panzarin, V., Bovo, G., Cattoli, G., Capua, I., & Terregino, C. (2014). Comparative pathogenicity study of ten different betanodavirus strains in experimentally infected European sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.). *Journal of Fish Diseases*, 37(4), 371-383.

Venter, P. A., & Schneemann, A. (2008). Recent insights into the biology and biomedical applications of Flock House virus. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65(17), 2675-2687.

Verrier, E. R., Langevin, C., Benmansour, A., & Boudinot, P. (2011). Early antiviral response and virus-induced genes in fish. *Developmental and Comparative Immunology*, 35(12), 1204-1214.

Vijaykrishna, D., Mukerji, R., & Smith, G. J. D. (2015). RNA Virus Reassortment: An Evolutionary Mechanism for Host Jumps and Immune Evasion. *PLoS Pathogens*, 11(7), 1-6.

Vimal, S., Abdul Majeed, S., Nambi, K. S. N., Madan, N., Farook, M. A., Venkatesan, C., Taju, G., Venu, S., Subburaj, R., Thirunavukkarasu, A. R., & Sahul Hameed, A. S. (2014). Delivery of DNA vaccine using chitosan-tripolyphosphate (CS/TPP) nanoparticles in Asian sea bass, *Lates calcarifer* (Bloch, 1790) for protection against nodavirus infection. *Aquaculture*, 420-421, 240-246.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Vimal, S., Farook, M. A., Madan, N., Abdul Majeed, S., Nambi, K. S. N., Taju, G., Sundarraj, N., Venu, S., Subburaj, R., Thirunavukkarasu, A. R., & Sahul Hameed, A. S. (2016). Development, distribution and expression of a DNA vaccine against nodavirus in Asian Seabass, *Lates calcarifer* (Bloch, 1790). *Aquaculture Research*, 47(4), 1209-1220.

Volpe, E., Grodzki, M., Panzarin, V., Guercio, A., Purpari, G., Serratore, P., & Ciulli, S. (2018). Detection and molecular characterization of betanodaviruses retrieved from bivalve molluscs. *Journal of Fish Diseases*, 41(4), 603-611.

Volpe, E., Gustinelli, A., Caffara, M., Errani, F., Quaglio, F., Fioravanti, M. L., & Ciulli, S. (2020). Viral nervous necrosis outbreaks caused by the RGNNV/SJNNV reassortant betanodavirus in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*, 523(February), 735155.

Vossen, M. T. M., Westerhout, E. M., Söderberg-Nauclér, C., & Wiertz, E. J. H. J. (2002). Viral immune evasion: A masterpiece of evolution. *Immunogenetics*, 54(8), 527-542.

Wallace, R. L., Snell, T. W., & Smith, H. A. (2015). Phylum Rotifera. In *Thorp and Covich's Freshwater Invertebrates (Fourth Edition): Ecology and General Biology*. Academic Press.

Wang, Y. D., Kung, C. W., & Chen, J. Y. (2010). Antiviral activity by fish antimicrobial peptides of epinecidin-1 and hepcidin 1-5 against nervous necrosis virus in medaka. *Peptides*, 31(6), 1026-1033.

Wang, W., Zhang, M., Xiao, Z. Zhong, & Sun, L. (2012). *Cynoglossus semilaevis* ISG15: A secreted cytokine-like protein that stimulates antiviral immune response in a LRGG motif-dependent manner. *PLoS ONE*, 7(9), 1-11.

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.

Wildt, M., & Harzsch, S. (2002). A new look at an old visual system: Structure and development of the compound eyes and optic ganglia of the brine shrimp *Artemia salina* Linnaeus, 1758 (*Branchiopoda, Anostraca*). *Journal of Neurobiology*, 52(2), 117–132.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Wu, H. C., Chiu, C. S., Wu, J. L., Gong, H. Y., Chen, M. C., Lu, M. W., & Hong, J. R. (2008). Zebrafish anti-apoptotic protein zfBcl-xL can block betanodavirus protein α-induced mitochondria-mediated secondary necrosis cell death. *Fish and Shellfish Immunology*, 24(4), 436-449.

Wu, H. C., Wu, J. L., Chu, H. L., Su, Y. C., & Hong, J. R. (2010a). RGNNV induces mitochondria-mediated cell death via newly synthesized protein dependent pathway in fish cells. *Fish and Shellfish Immunology*, 29(3), 451-463.

Wu, M. S., Chen, C. W., Liu, Y. C., Huang, H. H., Lin, C. H., Tzeng, C. S., & Chang, C. Y. (2012). Transcriptional analysis of orange-spotted grouper reacting to experimental grouper iridovirus infection. *Developmental and Comparative Immunology*, 37(2), 233-242.

Wu S, Sun M, Zhang L, Kang S, Liao J, Zhu Z, Chen H, Xu Z, Xu L, Zhang X, Wei J, Qin Q. (2022). Grouper TRAF3 inhibits nodavirus infection by regulating the STING-mediated antiviral signaling pathway. *Fish and Shellfish Immunology*, 123:172-181.

Wu, Y. C., & Chi, S. C. (2006). Persistence of betanodavirus in Barramundi brain (BB) cell line involves the induction of interferon response. *Fish and Shellfish Immunology*, 21(5), 540-547.

Wu, Y., Zhou, Y., Cao, Z., Sun, Y., Chen, Y., Xiang, Y., Wang, L., Zhang, S., & Guo, W. (2019). Comparative analysis of the expression patterns of IL-1β, IL-11, and IL-34 in golden pompano (*Trachinotus ovatus*) following different pathogens challenge. *Fish and Shellfish Immunology*, 93(August), 863-870.

Wu, Y. C., Tsai, P. Y., Chan, J. C., & Chi, S. C. (2016). Endogenous grouper and barramundi Mx proteins facilitated the clearance of betanodavirus RNA-dependent RNA polymerase. *Developmental and Comparative Immunology*, 59, 110-120.

Xu, H. D., Feng, J., Guo, Z. X., Ou, Y. J., & Wang, J. Y. (2010b). Detection of red-spotted grouper nervous necrosis virus by loop-mediated isothermal amplification. *Journal of Virological Methods*, 163(1), 123-128.

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.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

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.

Yan, D. C., Feng, S. Y., Huang, J., & Dong, S. L. (2007). Rotifer cellular membranes bind to white spot syndrome virus (WSSV). *Aquaculture*, 273(4), 423–426.

Yang, Z., Hua Yue, G., y Wong, SM. (2022). VNN disease and status of breeding for resistance to NNV in aquaculture. *Aquaculture and Fisheries*, 7, 147-157.

Yarahmadi, P., Miandare, H. K., Fayaz, S., & Caipang, C. M. A. (2016). Increased stocking density causes changes in expression of selected stress- and immune-related genes, humoral innate immune parameters and stress responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish and Shellfish Immunology*, 48, 43–53.

Yasuike, M., Kondo, H., Hirono, I., & Aoki, T. (2011). Identification and characterization of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* interferon-stimulated gene 15 (Jf-ISG15). *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 34(1), 83-91.

Yoshikoshi, K., & Inoue, K. (1990). Viral nervous necrosis in hatchery-reared larvae and juveniles of Japanese parrotfish, *Oplegnathus fasciatus* (Temminck & Schlegel). *Journal of Fish Diseases*, 13(1), 69-77.

Yoshimizu, M., Takizawa, H., Kamei, Y., & Kimura, T. (1986). Interaction beween fish pathogenic viruses and microorganisms in fish rearing water: survival and inactivation of infectious pancreatic necrosis virus, infectious hematopoietic necrosis virus and *Oncorhynchus masou* virus in rearing water. *Fish Pathology*, 21(4), 223–231.

Zhang, J. S., Dong, S. L., Tian, X. L., Dong, Y. W., Liu, X. Y., & Yan, D. C. (2006). Studies on the rotifer (*Brachionus urceus* Linnaeus, 1758) as a vector in white spot syndrome virus (WSSV) transmission. *Aquaculture*, 261(4), 1181–1185.

Zhang, W., Jia, P., Lu, X., Chen, X., Weng, J., & Jia, K. (2022). Capsid protein from red-spotted grouper nervous necrosis virus induces incomplete autophagy by inactivating the HSP90ab1-AKT-MTOR pathway. *Zoological Research*, 43(1), 98-110

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Zhang, W., Jia, K., Jia, P., Xiang, Y., Lu, X., Liu, W., & Yi, M. (2020). Marine medaka heat shock protein 90ab1 is a receptor for red-spotted grouper nervous necrosis virus and promotes virus internalization through clathrin-mediated endocytosis. *PLoS Pathogens*, 16(7), 1-21.

Zhang Y., Huang Liwei, Gao Xiaolin, Qin Qiwei, Huang Xiaohong, y Huang Youhua. (2022). Grouper USP12 exerts antiviral activity against nodavirus infection. *Fish & Shellfish Immunology*, 121, 332-341.

Zhong, W., & Rueckert, R. R. (1993). Flock house virus: down-regulation of subgenomic RNA3 synthesis does not involve coat protein and is targeted to synthesis of its positive strand. *Journal of Virology*, 67(5), 2716-2722.

Zhou, L., Li, P., Ni, S., Yu, Y., Yang, M., Wei, S., & Qin, Q. (2017a). Establishment and characterization of a mid-kidney cell line derived from golden pompano *Trachinotus ovatus*, a new cell model. *Journal of Fish Diseases*, 40(12), 1831-1838.

Zhou, X., Jiang, W., Liu, Z., Liu, S., & Liang, X. (2017b). Virus infection and death receptor-mediated apoptosis. *Viruses*, 9(11).

Zhu, S., Miao, B., Zhang, Y. Z., Wang, D. S., & Wang, G. X. (2022). Amantadine, a promising therapeutic agent against viral encephalopathy and retinopathy. *Journal of Fish Diseases*, 45(3), 451-459.

Zou, J., & Secombes, C. J. (2011). Teleost fish interferons and their role in immunity. *Developmental and Comparative Immunology*, 35(12), 1376-1387.

Zou, Z., Zheng, Q., Cai, J., Tang, J., Xia, L., Li, P., & Jian, J. (2021). Identification of BAG5 from orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) involved in viral infection. *Developmental and Comparative Immunology*, 116(1), 103916.

Zrncic, S., Brnic, D., Panzarin, V., Abbadi, M., Lojkic, I., Zupicic, I. G., & Oraic, D. (2022). Transmission Pathways of the VNN Introduced in Croatian Marine Aquaculture. *Pathogens*, 11, 418.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ANEXOS

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Los resultados obtenidos en esta tesis doctoral han sido publicados (a excepción del primer capítulo, que se encuentra en preparación) en revistas de alto impacto internacional. A continuación, se citan dichos artículos por orden de aparición en el texto.

- **Capítulo II: Vázquez-Salgado, L.**, Pascoli, F., Marsella, A., Biasini, L., Buratin, A., Pretto, T., Abbadi, M., Melchiotti, E., Bandín, I., and Toffan, A. (2022). Role of rotifers in Betanodavirus transmission to European sea bass larvae. Frontiers in Veterinary Science – Veterinary Infectious Diseases, 9:932327. https://doi.org/10.3389/fvets.2022.932327
    - Contribución: Lucía Vázquez-Salgado realizó las infecciones experimentales, los análisis virológicos, y participó en la redacción de la publicación.
    - Factor de impacto (2021): 3,471 (Q1, Ciencias Veterinarias)
    - Autorización de la revista: Los artículos publicados en *Frontiers in Veterinary Science* están en abierto, con licencia *Creative Commons*, que permite su uso, distribución y reproducción sin restricciones (Adjunto permiso al final).
- **Capítulo III: Vázquez-Salgado, L**., Olveira, J.G., Dopazo, C.P., and Bandín, I. (2020). Role of rotifer (*Brachionus plicatilis*) and *Artemia* (*Artemia salina*) nauplii in the horizontal transmission of a natural nervous necrosis virus (NNV) reassortant strain to Senegalese sole (*Solea senegalensis*) larvae. Veterinary Quarterly, 40, 205–214. https://doi.org/10.1080/01652176.2020.1810357
    - Contribución: Lucía Vázquez-Salgado realizó las infecciones experimentales, los análisis virológicos, y participó en la redacción de la publicación.
    - Factor de impacto: 3,32 (Q1, Ciencias Veterinarias)
    - Autorización de la revista: Los artículos publicados en *Veterinary Quarterly* están en abierto, con licencia *Creative*

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Commons, que permite su uso, distribución y reproducción sin restricciones (Adjunto permiso al final).

- **Capítulo IV: Vázquez-Salgado, L.**, Olveira, J.G., Dopazo, C.P., and Bandín, I. (2022). Interspecies transmission between *Solea senegalensis* and *Sparus aurata* of reassortant Nervous Necrosis Virus (NNV) strains and effect of stress on the outcome of the infection. Aquaculture, 547:737519. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737519
    - Contribución: Lucía Vázquez-Salgado realizó las infecciones experimentales, los análisis virológicos, y participó en la redacción de la publicación.
    - Factor de impacto 2021: 5,135 (Q1, Pesca; Biología marina y de agua dulce)
    - Autorización de la revista: Como autor de esta publicación, tengo el derecho de incluir el contenido de la misma en la tesis doctoral (Adjunto permiso al final).
- **Capítulo V: Vázquez-Salgado, L.**, Olveira, J.G., Dopazo, C.P., and Bandín, I. (2021). Effect of rearing density on nervous necrosis virus infection in Senegalese sole (*Solea senegalensis*). Journal of Fish Diseases, 44, 2003–2012. https://doi.org/10.1111/jfd.13514
    - Contribución: Lucía Vázquez-Salgado realizó las infecciones experimentales, los análisis virológicos, y participó en la redacción de la publicación.
    - Factor de impacto: 2,58 (Q1, Ciencias Veterinarias)
    - Autorización de la revista: Se concede el permiso de manera personal e intransferible para reproducir el contenido de esta publicación en el fin indicado en la solicitud de permiso (Adjunto permiso al final).
- **Capítulo VI: Vázquez-Salgado, L.**, Olveira, J.G., and Bandín, I. (2022). Nervous necrosis virus viability modulation by water salinity

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

and temperature. Journal of Fish Diseases, 45, 561-568. https://doi.org/10.1111/jfd.13581

- Contribución: Lucía Vázquez-Salgado realizó los ensayos de laboratorio, los análisis virológicos, y participó en la redacción de la publicación.
- Factor de impacto (2021): 2,58 (Q1, Ciencias Veterinarias)
- Autorización de la revista: Se concede el permiso de manera personal e intransferible para reproducir el contenido de esta publicación en el fin indicado en la solicitud de permiso (Adjunto permiso al final).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Role of rotifers in Betanodavirus transmission to European sea bass larvae

Lucia Vázquez-Salgado[1], Francesco Pascoli[2, 3], Andrea Marsella[2, 3], Lorena Biasini[2, 3], Alessandra Buratin[2, 3], Tobia Pretto[2, 3], Miriam Abbadi[2, 3], Erica Melchiotti[2, 3], Isabel Bandín[1] and Anna Toffan[2, 3*]

[1] Unidad de Ictiopatología, Departamento de Microbioloxía e Parasitoloxía, Instituto de Acuicultura, Universidade de Santiago de Compostela, Spain
[2] National Reference Centre for Fish, Crustacean and Mollusc Pathology, Experimental Zooprophylactic Institute of the Venezie (IZSVe), Italy
[3] OIE Reference Laboratory for Viral Encephalo-retinopathy, Italy

Provisionally accepted: The final, formatted version of the article will be published soon.

Notify me

Marine invertebrates as rotifers or Artemia, frequently used for fish larvae feeding, can be a potential source of pathogens. It has been demonstrated that Artemia can act as an NNV-vector to Senegalese sole larvae. Therefore, in this study we aimed to clarify the role of rotifers in NNV transmission to sea bass larvae following an oral challenge. Our results showed that sea bass larvae fed on a single dose of rotifers retaining NNV displayed clinical signs, mortality, and viral replication similar to the immersion challenge, although the course of the infection was slightly different between the two infection routes. Furthermore, we also demonstrate that rotifers can internalise NNV particles due to their filtering nature and maintain virus viability, since viral particles were detected by immunohistochemistry, immunofluorescence and cell culture within the rotifer body. However, viral quantification data suggested that rotifers are not permissive to NNV replication. In conclusion, this research demonstrated NNV horizontal transmission through rotifers to sea bass larvae, highlighting the importance of establishing strict routine controls on live food to prevent the introduction of potential pathogens to hatcheries.

Keywords: Rotifer (Brachionus plicatilis), Vector, Sea bass larvae, Nodavirus (NNV), RGNNV, transmission, Oral infection

Received: 29 Apr 2022; **Accepted:** 09 Jun 2022.

Copyright: © 2022 Vázquez-Salgado, Pascoli, Marsella, Biasini, Buratin, Pretto, Abbadi, Melchiotti, Bandín and Toffan. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

frontiers | Frontiers in Veterinary Science

ORIGINAL RESEARCH
published: 29 July 2022
doi: 10.3389/fvets.2022.932327

Role of Rotifers in Betanodavirus Transmission to European Sea Bass Larvae

*Lucia Vázquez-Salgado[1], Francesco Pascoli[2], Andrea Marsella[2], Lorena Biasini[2], Alessandra Buratin[2], Tobia Pretto[2], Miriam Abbadi[2], Erica Melchiotti[3], Isabel Bandín[1] and Anna Toffan[2]**

[1] Departamento de Microbiología y Parasitología, Instituto de Acuicultura, Universidade de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain, [2] Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, OIE Reference Laboratory for Viral Encephalo-Retinopathy, National Reference Laboratory for Fish Diseases Legnaro, Padova, Italy, [3] Department of Histopathology, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie Legnaro, Padova, Italy

Marine invertebrates such as rotifers or *Artemia*, frequently used for fish larvae feeding, can be a potential source of pathogens. It has been demonstrated that *Artemia* can act as a nervous necrosis virus (NNV)-vector to Senegalese sole larvae. Therefore, in this study, we aimed to clarify the role of rotifers in NNV transmission to sea bass larvae following an oral challenge. Our results showed that sea bass larvae fed on a single dose of rotifers retaining NNV displayed clinical signs, mortality, and viral replication similar to the immersion challenge, although the course of the infection was slightly different between the two infection routes. Furthermore, we also demonstrated that rotifers can internalize NNV particles due to their filtering nature and maintain virus viability since viral particles were detected by immunohistochemistry, immunofluorescence, and cell culture within the rotifer body. However, viral quantification data suggested that rotifers are not permissive to NNV replication. In conclusion, this research demonstrated NNV horizontal transmission through rotifers to sea bass larvae, highlighting the importance of establishing strict routine controls on live food to prevent the introduction of potential pathogens to hatcheries.

Keywords: rotifer (*Brachionus plicatilis*), vector, sea bass larvae, nodavirus (NNV), RGNNV, transmission, oral infection

OPEN ACCESS

Edited by:
Bartolomeo Gorgoglione, Michigan State University, United States

Reviewed by:
Uwe Fischer, Friedrich-Loeffler-Institute, Germany
Jingfeng Sun, Tianjin Agricultural University, China
Dieter Steinhagen, University of Veterinary Medicine Hannover, Germany

***Correspondence:**
Anna Toffan
atoffan@izsvenezie.it

Specialty section:
This article was submitted to Veterinary Infectious Diseases, a section of the journal Frontiers in Veterinary Science

Received: *29 April 2022*
Accepted: *09 June 2022*
Published: *29 July 2022*

Citation:
Vázquez-Salgado L, Pascoli F, Marsella A, Biasini L, Buratin A, Pretto T, Abbadi M, Melchiotti E, Bandín I and Toffan A (2022) Role of Rotifers in Betanodavirus Transmission to European Sea Bass Larvae. Front. Vet. Sci. 9:932327. doi: 10.3389/fvets.2022.932327

INTRODUCTION

Viral encephalopathy and retinopathy (VER) is a neurological pathology of fish caused by the nervous necrosis virus (NNV; G. *Betanodavirus*, F. *Nodaviridae*) that provokes high mortalities, especially in the early stages of development, and leads to great economic losses in the farming industry throughout the world (1). The viral genome is composed of two molecules of (+) ssRNA, known as RNA1 and RNA2, encoding the viral polymerase (RdRp) and the coat protein, respectively (2). A third RNA molecule is synthesized during the infection process, namely, RNA3, and encodes two non-structural proteins that favor viral replication by suppressing cell apoptosis and silencing interfering RNAs (3, 4). The RNA2 segment contains the T4 region, which enables the classification of the NNV into four genotypes, namely, barfin flounder (BFNNV), red-spotted grouper (RGNNV), striped jack (SJNNV), and tiger puffer nervous necrosis virus (TPNNV) (5). In addition, natural reassortants containing RNA1 and RNA2 typed as RGNNV or SJNNV

(RGNNV/SJNNV and SJNNV/RGNNV) have been reported in farmed and wild fish from southern Europe (6–9).

Betanodavirus transmission in nature can occur horizontally or vertically (1). The horizontal route involves transmission through the water column or by contact between infected or asymptomatic carriers with susceptible healthy animals (10). Wild marine invertebrates as well as some zooplankton species including the crustacean *Artemia salina* or the rotifer *Brachionus plicatilis*, which are commonly used as starting food for marine larvae, have shown to be NNV reservoirs or vectors (11–18). In fact, a reassortant NNV strain was isolated from the brine shrimp *Artemia salina* (8), and this crustacean was shown to effectively transmit NNV infective particles to Senegalese sole (*Solea senegalensis*) larvae causing disease signs and high mortality (19). However, there is no evidence of the role of rotifers in NNV transmission to fish larvae. This study aimed to assess NNV transmission through rotifers to European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae, one of the most farmed fish species in Mediterranean aquaculture.

METHODOLOGY

Viral Inoculum Production

The RGNNV-type strain 283.2009 isolated in Italy from farmed European sea bass, showing mass mortalities (8), was used in this study. The viral strain was propagated in E-11 cell monolayers, a cell clone derived from SSN-1 cell line (20), grown for 24 h in 75 cm^2 tissue culture flasks with the Minimum Essential Medium (MEM) containing 10% fetal bovine serum (FBS), 1% glutamine, and 1% antibiotics (penicillin and streptomycin). Prior to viral inoculation, the cell culture medium was replaced with MEM FBS-free and incubated at 25°C. When the cytopathic effect (CPE) was extended, the viral suspension was collected and centrifuged at 3,000 *g* for 15 min. Clarified virus suspension was stored at −80°C until use. Viral titer was calculated in quadruplicate in SSN-1 monolayers (striped snakehead, *Ophicephalus striatus*) using the end point procedure (21), and titers were expressed as $TCID_{50}$/ml.

Rotifer NNV-Exposure Assay

Rotifers (*Brachionus plicatilis*) were grown under continuous culture in 80-l opaque circular tanks with artificial seawater (salinity 37 PSU) at 27 ± 1°C and aeration. Cultures were fed daily with the NannoStar rotifer diet (AlgaSpring, The Netherlands), a commercial product containing concentrated *Nannochloropsis* adequate for a correct rotifer performance.

This assay was performed using one rotifer batch (∼10^6 rotifers) challenged by bath immersion with the 283.2009 strain (10^5 $TCID_{50}$/ml) in a 20-l tank for 24 h. Later, rotifers were filtered and rinsed with tap water and cultivated for an additional 6 days in virus-free water under previously described conditions. Rotifer samples (200 mg) were collected at 6, 12, 24, 48, 72, and 144 h post-challenge (hpc) and rinsed prior to performing the analysis. NNV-exposed rotifers were tested using the indirect fluorescence antibody test (IFAT) at 6, 12, and 24 h post-challenge and immunohistochemistry (IHC) at 6, 12, 24, and 48 hpc, while two-step quantitative real-time PCR (RT-qPCR) and virus isolation in cell culture were applied to challenged rotifers at all time points as described in the following sections. A 20-ml water aliquot was also collected from the tank at 10 min post-challenge in order to confirm the NNV dose.

A mock-challenged rotifer batch was also set up, handled, and tested as the NNV-exposed group.

Sea Bass Larvae Infection

European sea bass larvae (0 days post-hatch, $n = 60{,}000$) were purchased from a NNV-free commercial fish farm and housed at the experimental aquarium facilities of the Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSVe, Italy). Prior to performing the experimental infections, a 10 mg sample of larvae was analyzed and tested negative for the most common sea bass pathogens (bacteria and betanodavirus). Larvae were equally distributed in three opaque 300-l tanks (20,000 larvae per tank), filled with artificial salt water (salinity 35–27 PSU), and the temperature was maintained at 19 ± 1°C and oxygen at 6 ± 0.5 ppm. Larvae were kept in darkness until the adsorption of the yolk sac (∼9 days post-hatching), and later, they were maintained with an artificial photoperiod of 7 h of light and at 18°C. In addition, prior to the infection trials, larvae were fed for 3 days with *Nannochloropsis*-enriched rotifers to ensure an appropriate food intake.

Sea bass larvae were challenged at 12 days post-hatching (dph). The oral infection was carried out by feeding larvae from 1 tank ($n = 20{,}000$) with a single dose of NNV retaining rotifers (∼100 rotifers/larvae), as previously described in the "Rotifer NNV-exposure assay" section, for 18 h with the 283.2009 strain at 10^6 $TCID_{50}$/ml. NNV-exposed rotifers were rinsed carefully under tap water and concentrated in 20-l before their administration as feed to sea bass larvae. For comparative purposes, the remaining larvae were bath and mock-challenged for 1 h with the 283.2009 strain (10^5 $TCID_{50}$/ml) and MEM, respectively. Fish samples were collected daily from each of the three tanks for viral load quantification by RT-qPCR, titration in cell culture, and IHC. Larvae were also monitored daily for signs of disease.

Sample Processing

Viral Load Assessment by Titration ($TCID_{50}$)

Rotifer (200 mg) and larvae (40 larvae/time point) samples were manually homogenized in tubes containing sterile quartz sand and diluted in 500 and 330 µl of MEM, respectively. Then, homogenates were clarified by centrifugation for 2 min at 11,000 *g*, and the harvested supernatants were incubated overnight at 4°C with 1% antibiotic and antimycotic solution (10,000 IU/ml penicillin G, 10 mg/ml streptomycin sulfate, 25 µg/ml amphotericin B, 0.4% of 50 mg/ml kanamycin solution, and 1% of 50 mg/ml solution of polymyxin B sulfate) (Merck KGaA, Darmstadt, Germany).

The water aliquot was filtered using a 0.45 µm membrane and incubated overnight as previously described.

Samples were titrated on semiconfluent SSN-1 monolayers as detailed in the "Viral Inoculum Production" section.

The samples that showed the absence of CPE, corresponding to a viral titer below the limit of detection of the cell culture titration, was given the arbitrary value of 10^0 $TCID_{50}$/ml.

RNA1 Quantification by RT-qPCR

Rotifer (triplicate of 20 mg each) and pooled larvae ($n = 15$; triplicate pools of 5 larvae each) samples were homogenized with stainless steel beads in a TissueLyser II (Qiagen, Hilden, Germany). The total RNA was extracted from homogenized rotifers, larvae samples, and the water aliquot using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) following the manufacturer's instructions. RNA integrity was verified in an Agilent 2100 Bioanalyzer System using an Agilent RNA 6000 Nano Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, USA), and concentration was estimated using the Qubit™ RNA BR Assay kit in a Qubit™ 4 Fluorometer (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA). The RNA amount of all samples was normalized in molecular-grade water prior to performing the reverse transcription. For the RNAs of rotifers and water, the normalization was carried out based on the starting weight and volume of samples, respectively, assuming a 100% RNA extraction yield. The larvae RNA normalization, however, was based on the concentration of total RNA extracted. RNA reverse transcription was performed using a SuperScript™ III Reverse Transcriptase Kit (Invitrogen by Thermofisher Scientific, Waltham, USA). In brief, complementary DNA (cDNA) was synthesized starting from normalized RNA equivalent to 400 µg of rotifer, 4 µl of water, and 80 ng of total larvae RNA. The reaction was performed in 20 µl final volume using 50 pmol of random hexamers and 10 mmol of dNTPs. The thermal profile consisted of a preincubation step for 5 min at 65°C followed by incubation on ice for at least 5 min, then 5 min at 25°C, 1 h at 50°C, and 15 min at 70°C. Real-time PCR, targeting the RNA1 molecule, was performed in 25 µl final volume using the SsoFast™ EvaGreen® Supermix (BioRad, Hercules, USA), 5 µl of obtained cDNA, and 0.5 µM of each forward and reverse primer set (RNA1_FOR 5′-ATCACTGACGACTCCGTTCACTACCG-3′ and RNA1_REV 5′-CATACATGGTATCCTGGTTGTAGTTCC-3′). RT-qPCR reactions were performed in a CFX96™ Real-Time System (BioRad, Hercules, USA) and the amplification thermal profile consisted of an activation step of 30 s at 95°C followed by 40 cycles of denaturation (5 s at 95°C) and an annealing-extension step (5 s at 60°C). The reactions were terminated with a final melting temperature curve analysis from 65 to 95°C (5 s/step, ramp rate 0.5°C/s). Absolute RNA1 quantification was estimated by comparing obtained quantification cycle (Cq) values with standard curves prepared using 6 dilutions (10^7-10^2 copy numbers/reaction) of synthetic RNA1 tested in triplicate. Synthetic RNA1 was produced according to Toffan et al. (22). Viral quantification was expressed as logarithmic values of RNA1 copy number (LCN) detected in 100 µg (rotifers), 1 µl (water), or 20 ng of total RNA (larvae). Hereafter, the reported LCN values refer to the mean of the 3 analyzed biological replicates. To give better representativeness of the entire population, LCN values below the limit of quantification (LoQ) were also included in the analysis, even though considered numerically less reliable. The undetected samples were given the arbitrary value of 0 LCN.

Rotifer IFAT

Rotifer samples (6, 12, and 24 hpc) were preserved and fixed in buffered formalin 4% (VWR International Srl, Italy) at 4°C until use. Prior to performing the IFAT, samples were washed with PBS-Tween (0.05%) and blocked with 0.05% (w/v) bovine serum albumin (BSA) for 30 min at 37°C. First, rotifers were incubated with an anti-RGNNV polyclonal serum (1:1,000) produced in-house (pAb 283) (23) and then with FITC conjugated goat anti-rabbit serum (1:100) (Merck, Darmstadt, Germany). Both incubations were performed for 1 h at 37°C. Fluorescence was observed in a Zeiss Axioskop microscope equipped with an Axiocam MRC 5.

Rotifer and Larvae IHC Staining

Rotifer samples were collected at 6, 12, 24, and 48 hpc, while the mock-challenged rotifer control was collected at 24 h.

Samples from sea bass larvae ($n = 20$) and rotifers were fixed in 10% buffered formalin and processed for histopathological and IHC examination (22). In brief, samples were dehydrated through a graded ethanol-xylene series and embedded in paraffin. Sections of 3 µm were first deparaffinized, rehydrated, and then stained with hematoxylin-eosin (H&E) for histopathological examination. IHC was performed automatically from de-waxing to counter-staining using the Discovery-Ultra instrument (Ventana Medical Systems Inc., Tucson, USA).

Following antigen retrieval with Protease 2 (Ventana Medical Systems Inc., Tucson, USA) for 32 min at 36°C, the IHC reaction was performed with rabbit anti-RGNNV polyclonal serum produced in-house (pAb 283) (23), at the dilution of 1:5,000 in antibody diluent (Ventana Medical Systems Inc., Tucson, USA) for 1 h at room temperature. Samples were incubated with the secondary antibody and conjugated with alkaline phosphatase UltraMap Rabbit AP for 16 min and Chromogen Discovery Red for 32 min (Ventana Medical Systems Inc., Tucson, USA). Slides were then counterstained with Mayer's hematoxylin for 8 min, air-dried, dipped in xylene, and mounted in Eukitt medium (Kaltek, Saonara, Italy). The presence of betanodavirus antigens was characterized by bright red color.

Statistical Analysis

Statistical tests were conducted using GraphPad Prism 8.0 (San Diego, California, USA). LCN data represent the mean of 3 replicates per time point. The dataset was first checked for normality using the Shapiro-Wilk test. Significant differences in viral loads between the two infection routes were assessed using two-way ANOVA and Sidak's correction, and $p < 0.05$ indicates statistically significant differences.

RESULTS

Rotifer Challenge

Viral Load: $TCID_{50}$ and LCN

Viral load quantification in rotifers was evaluated by observing both the viral titers and the LCN values over time (**Figure 1**).

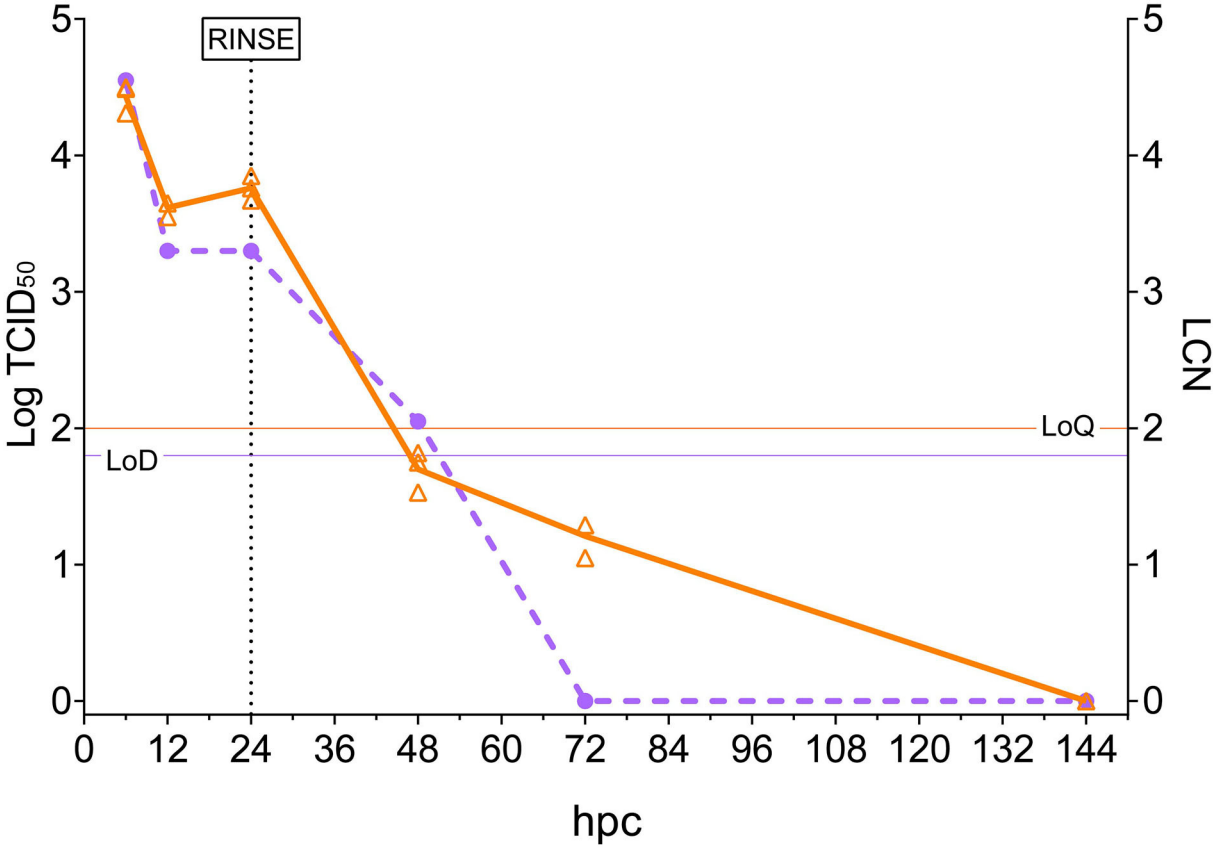


FIGURE 1 | Rotifer nervous necrosis virus (NNV) challenge. The *x*-axis represents the observation period expressed as hours post-challenge (hpc). The left *y*-axis reports quantified viral loads expressed as Log_{10} of $TCID_{50}$/ml, and values are depicted as circles. A dashed purple line shows the trend of $TCID_{50}$/ml in time. The right *y*-axis reports quantified viral load expressed as LCN/100 μg, and values are depicted as triangles (three biological replicates for each sampling). A solid orange line shows the trend of mean LCN values in the time. Thin horizontal lines represent the limit of detection (LoD) or the limit of quantification (LoQ) of the methods. The vertical dashed line indicates the time in which NNV-exposed rotifers were rinsed and started their housing in NNV-free water.

The highest values, in both viable particles and genomic load, were recorded at 6 hpc ($10^{4.55}$ $TCID_{50}$/ml and 4.43 LCN). At 12 hpc, a 1-log decrease was observed in the rotifer viral load ($10^{3.30}$ $TCID_{50}$/ml and 3.62 LCN) and remained almost stable until 24 hpc. Then, rotifers were filtered, rinsed, and placed in virus-free water. Samples from the subsequent time points showed a rapid and continuous decrease in viral loads. In fact, while a low titer ($10^{2.05}$ $TCID_{50}$/ml) was recorded at 48 hpc, no viral titers were detectable at 72 and 144 hpc. The same trend was observable while looking at the RT-qPCR results at 48 and 72 hpc (1.70 and 1.21 LCN respectively), and viral RNA was undetectable at 144 hpc. Moreover, the water aliquot collected from the challenge tank at 10 min pc was analyzed and displayed values of $10^{4.80}$ $TCID_{50}$/ml and 5.08 LCN. Such results confirmed the theoretical NNV challenge dose. Mock-challenged rotifers collected at 24 hpc tested negative with both methods (data not shown).

Indirect Fluorescence Antibody Test

The NNV-challenged rotifers appeared normal in shape (**Figure 2A**) and did not show any abnormal behavior or changes in swimming capacity. The immunofluorescence assay showed a slight fluorescence in rotifers at 6 hpc (**Figure 2B**), but the strongest signals, with similar intensity, were detected at 12 and 24 hpc (**Figure 2C**). Fluorescence was mainly concentrated in the anterior part of the rotifer body, particularly in the corona, the organ responsible for the internalization of particles suspended in the water, and in the cuticle, the organ surrounding the rotifer body. The immunofluorescence signal was revealed neither at later time points nor in rotifer eggs nor in the mock-challenged rotifer batch (**Figure 2D**).

IHC Staining

The IHC staining showed a positive signal at 6, 24, and 48 hpc. In detail, 283.2009-exposed rotifers initially evidenced the presence of IHC staining in the stomach and intestine lumen (**Figure 3A**) at 6 hpc, while at 24 (**Figure 3B**) and 48 hpc (**Figure 3C**), more IHC stainings were apparent in the pseudocoelom and in the inner side of the cuticle of NNV-challenged rotifers. No IHC signal was observed in the mock-challenged group (**Figure 3D**).

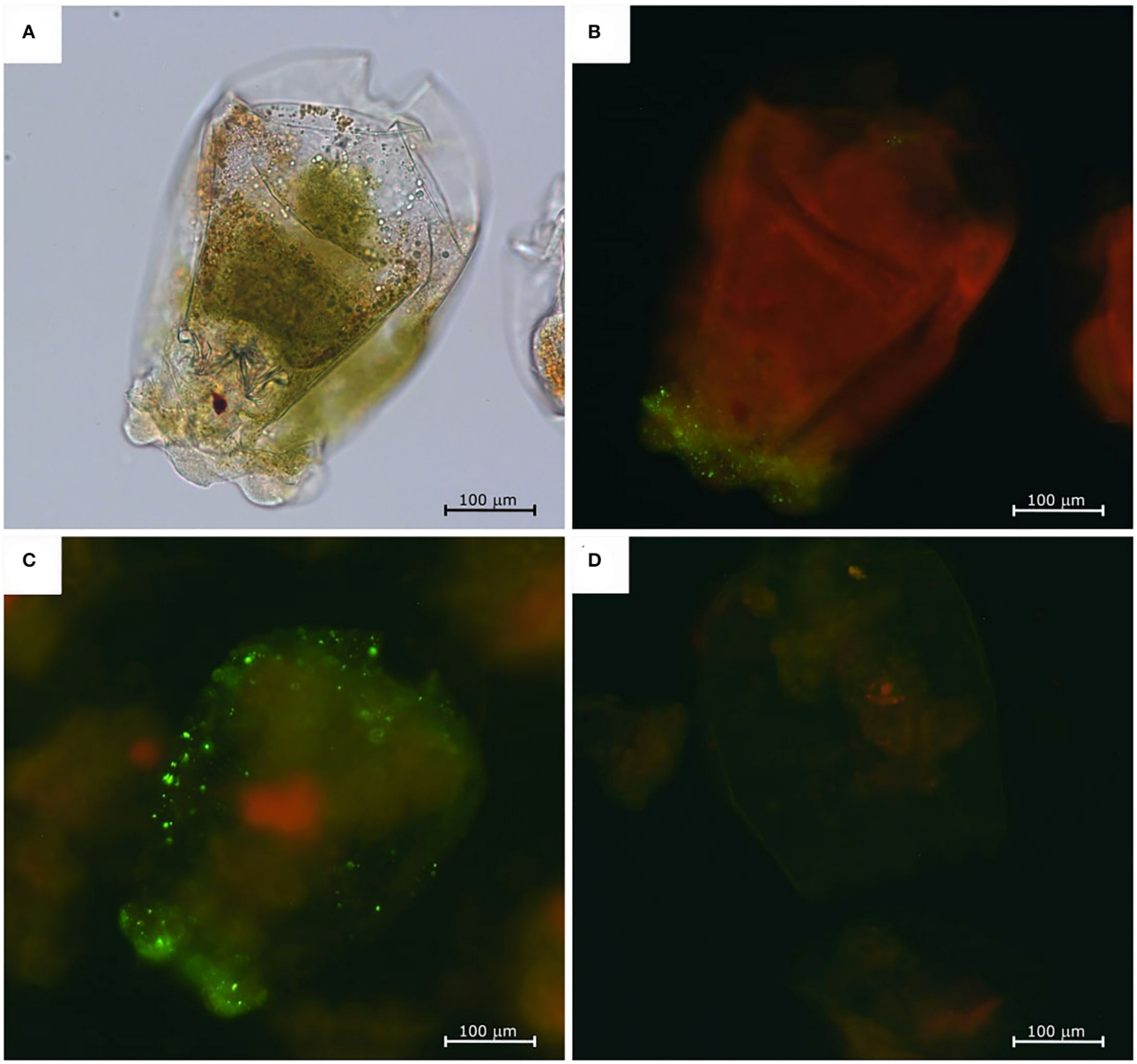


FIGURE 2 | Nervous necrosis virus-exposed rotifers immunofluorescence assay. Challenged rotifer at 6 hpc, normal appearance under a light microscope **(A)**, and fluorescent microscope **(B)**. Fluorescence staining is visible mainly in the crown area. Challenged rotifer at 24 hpc **(C)**, and fluorescence localized on the crown and in the pseudocoelom. Negative control at 24 h **(D)**.

Larvae Infection

Nervous necrosis virus-exposed rotifers showed a viral load of $10^{4.55}$ $TCID_{50}$/ml (4.25 LCN) at the moment of feeding sea bass larvae, and bath water from the larvae challenge titrated $10^{4.80}$ $TCID_{50}$/ml (4.63 LCN).

Oral infected larvae started to show common VER signs, consisting of abnormal swimming behavior, such as erratic swimming in circles or lying belly up, at 19 days postinfection (dpi), ending with the death of all individuals by 23 dpi. The bath infected group showed earlier disease signs (from 7 dpi), and no fish survived beyond day 12 pi. No VER signs were detected in the mock-challenged fish, and few losses were recorded during the challenge.

Viral Load Quantification by $TCID_{50}$

No NNV viable particles were detected during the first 5 dpi in sea bass larvae fed with rotifers retaining NNV (**Figure 4**). Later on, the viral titers fluctuated considerably between days 6 and 12. However, from day 13 onward, titers progressively increased until the onset of clinical signs on day 19 pi, reaching a maximum value of $10^{8.05}$ $TCID_{50}$/ml. Beyond this day and up to the end of the

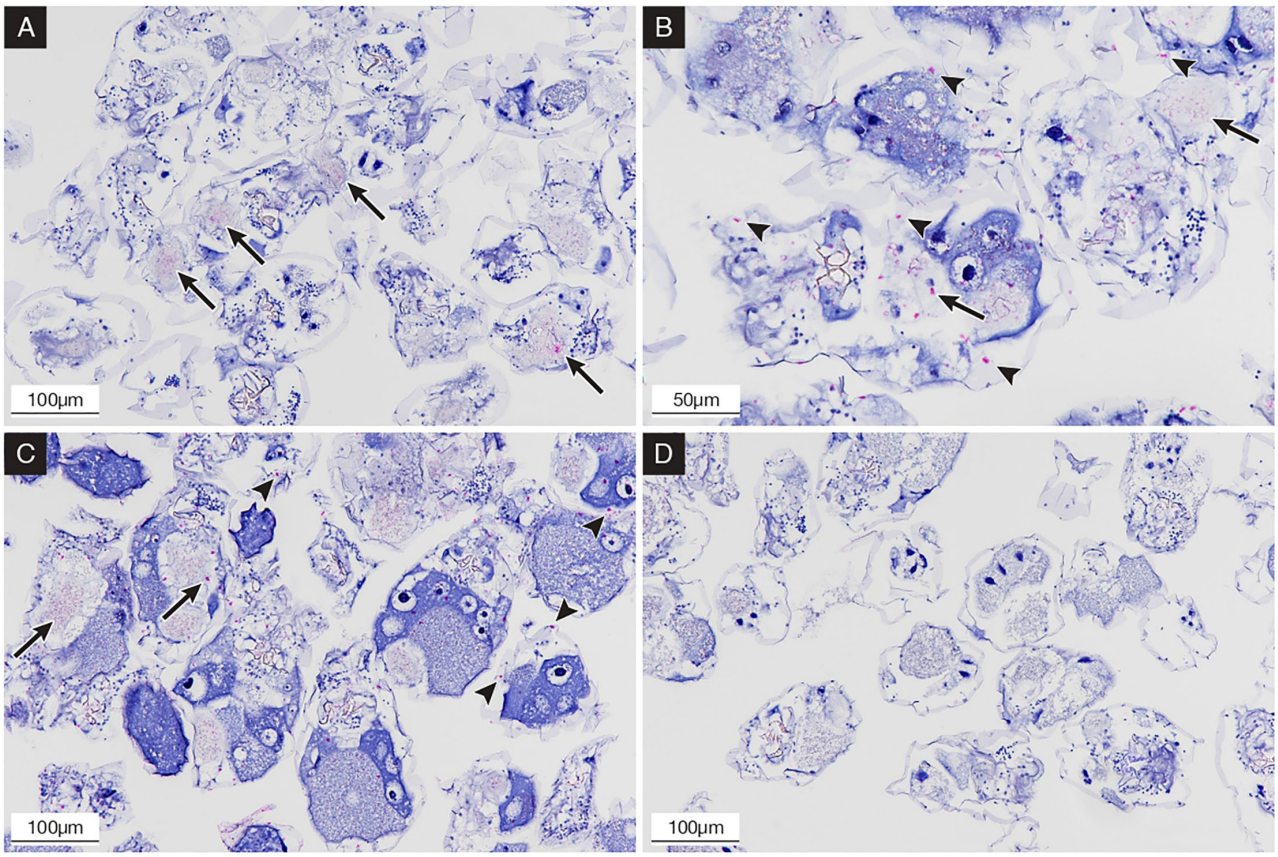


FIGURE 3 | Immunohistochemical (IHC) staining of NNV-exposed rotifers at 6, 24, and 48 hpc; the presence of betanodavirus antigens was revealed in bright red color. **(A)** 6 hpc; rotifers showing IHC staining in the stomach and intestinal tract (arrows); **(B)** 24 hpc; rotifers showing IHC staining in the gut content (arrows) and in the pseudocoelom and inner cuticle (arrowheads); **(C)** 48 hpc; rotifers showing increased IHC staining in pseudocoelom (arrowheads); **(D)** mock-challenged rotifers after 24 h, negative control with no evidence of staining.

experiment, the viral loads remained almost the same, albeit with slight fluctuations (ranging from $10^{7.80}$ to $10^{8.80}$ $TCID_{50}$/ml).

In larvae challenged by bath, the number of detected viable particles increased over time from $10^{2.30}$ $TCID_{50}$/ml at 1 dpi to $10^{10.05}$ $TCID_{50}$/ml on 9 dpi. Subsequently and until 12 dpi when all larvae were dead, the viral titers were maintained at such high values, ranging from $10^{7.80}$ to $10^{8.55}$ $TCID_{50}$/ml (**Figure 4**). Mock-challenged sea bass larvae tested negative at all time points (data not shown).

Viral Load Quantification by RT-qPCR

RNA1 copy number quantification was evaluated in samples of pooled sea bass and analyzed in triplicates (5 larvae each) until the end of the experiment (12 dpi in the bath infected group and 23 dpi in larvae fed with rotifers retaining NNV).

Larvae orally challenged (**Figure 5**) showed average viral loads below 2 LCN until day 8 pi, and although on days 5 and 6 pi, the average number of RNA copies showed a slight increase (3.01 and 2.54 LCN, respectively). In general, a strong heterogenicity among biological replicates was observed, with standard deviation (SD) values higher than 1 in several sampling time points and reaching 2.51 at 9 dpi. From day 9 pi onward, a rise in the RNA copy number was observed although some oscillations until day 14. From this time point, an increasing trend in viral loads was detected until day 20 pi (mean LCN = 8.35 ± 0.22 SD), and a small SD among replicates was also observed from day 17 pi. Later, the number of genomic copies remained at similar values until the end of the experiment.

Bath challenged larvae showed very homogeneous values of LCN within biological triplicates and high values starting from 1 dpi (3.84 LCN ± 0.15 SD) (**Figure 5**). The number of NNV genomic copies increased regularly until day 5 pi (8.87 LCN ± 0.25 SD), with a further slight increase until 8 dpi, to plateau later. Details regarding individual LCN values are provided in **Supplementary Material S2**. Notably, no significant differences ($p > 0.05$) in the final viral load were observed between both infection routes. Mock-challenged sea bass larvae tested negative at all time points (data not shown).

Histological and IHC Analysis

Oral infected larvae revealed the absence of IHC staining until 8 dpi when a single specimen (1+/13 larvae) showed

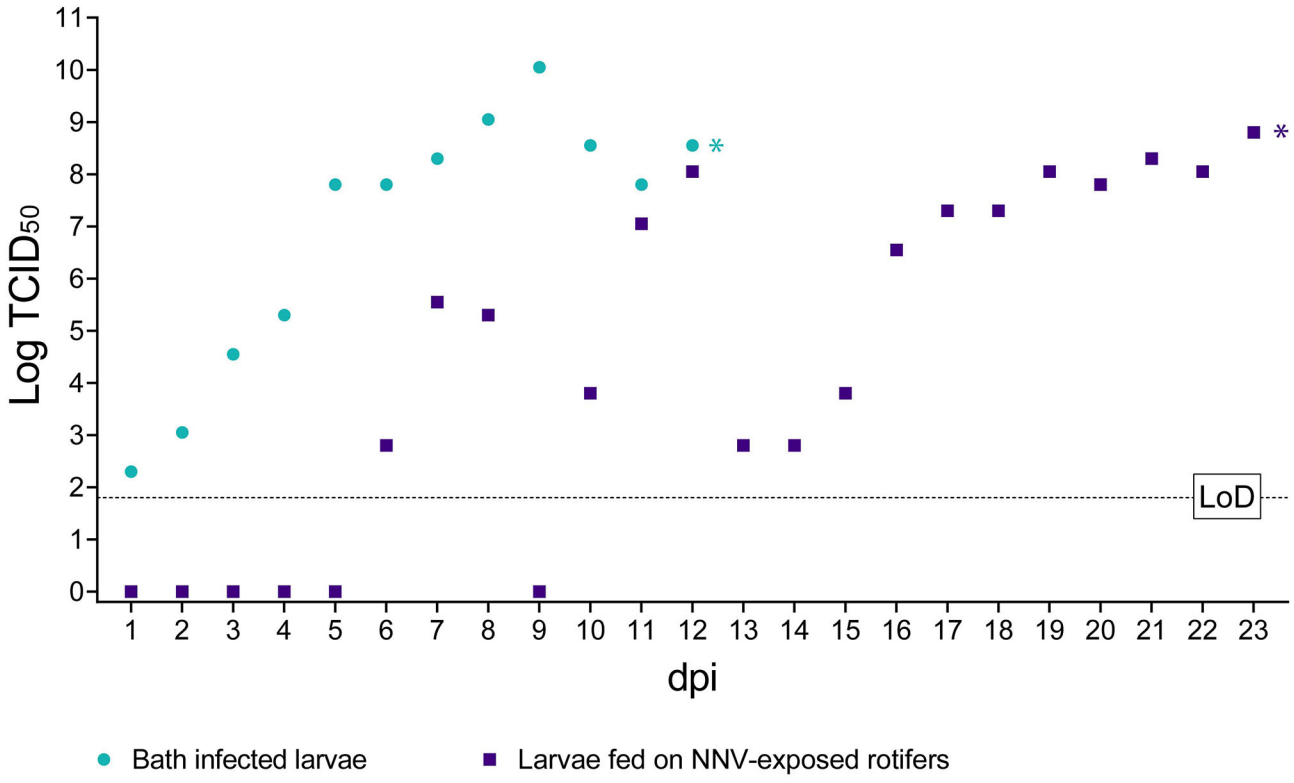


FIGURE 4 | Infectious titer of NNV detected in challenged larvae. The *x*-axis represents the observation period expressed as days post-infection (dpi). The *y*-axis represents quantified viral load expressed as Log_{10} of $TCID_{50}$/ml. Bath infected larvae values are depicted as green circles. Values of larvae fed on NNV-exposed rotifers are depicted as purple squares. A dashed horizontal line indicates the limit of detection (LoD). * Indicates the achievement of total mortality in both challenges.

the moderate presence of IHC staining in the encephalon, while the other larvae appeared negative. Only one specimen (1+/7) collected at 9 dpi showed intense IHC staining in the encephalon and retina with mild vacuolization (**Figure 6B**). Subsequently, no IHC positive specimens were observed until 15 dpi, followed by a progressive increase in the prevalence of positive larvae between 16 dpi and 19 dpi (**Figure 6D**), while after 20 dpi, all specimens appeared highly positive (details are provided in **Supplementary Material S1A**). With the exception of the early positive specimen at 9 dpi, vacuolization in the encephalon and spinal cord was increasingly observed after 16 dpi, while retinal vacuolization was recorded after 20 dpi (**Figure 6E**). Bath challenged larvae showed initial IHC staining in the central nervous system (CNS) starting from 3 dpi with a rapid increase in intensity and prevalence reaching 100% of positive larvae at 5 dpi, while IHC staining in the retina started at 5 dpi reaching 100% positive at 7 dpi. In the following sampling points, the prevalence and intensity of IHC staining (**Figure 6A**) remained the same until the end of the trial (day 12 pi) (details are provided in **Supplementary Material S1B**). Vacuolization of the CNS was noticeable from 6 dpi, whereas retinal vacuoles appeared from 8 dpi (**Figure 6C**). No IHC staining was ever detected in the mock-challenged larvae.

DISCUSSION

The NNV is considered a very hazardous aquatic pathogen threatening worldwide marine fish farms, with larvae and juveniles representing the most susceptible stages. To date, no effective therapy has been authorized to treat the disease and to prevent the loss of such large numbers of fish. Thus, it is critical to identify and assess potential routes of NNV entry into hatcheries, including the marine invertebrates used as starting feed for fish larval stages.

In this study, we have demonstrated the role of rotifers in transmitting NNV to sea bass larvae. Sea bass is one of the most valuable species in southern European aquaculture and is severely affected by RGNNV strains (1, 24–26). The results obtained revealed that just one administration of rotifers retaining NNV is sufficient to cause disease and 100% mortality in sea bass larvae as occurred in the bath infection, suggesting that the intake of live feed retaining NNV can trigger a VNN outbreak in a hatchery. However, the course of oral and bath infection was different, in contrast to findings by Lampou et al. (27), who reported a similar disease progression in infection *via* the skin or the esophagus. In particular, in our results, it was observable that regardless of the assay used (IHC analysis, viral titration, and viral genome quantification), orally infected individuals showed

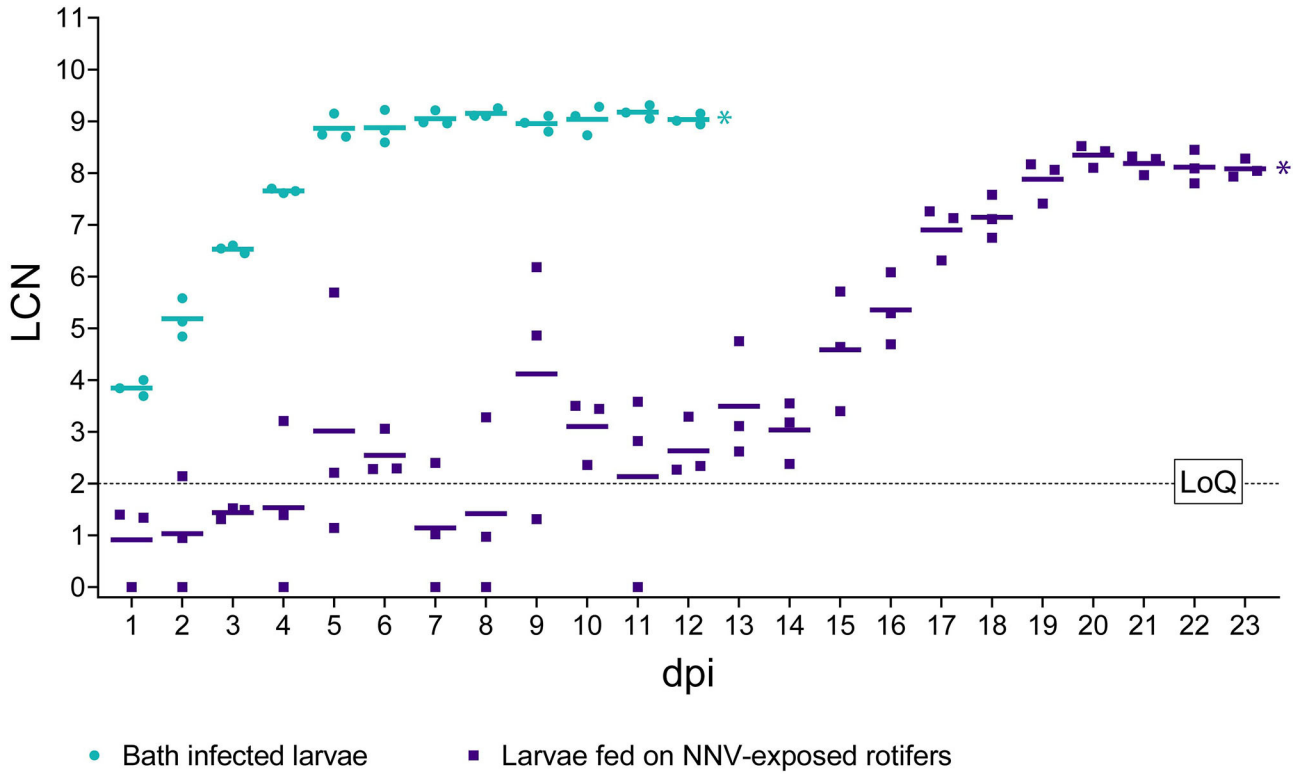


FIGURE 5 | RT-qPCR results in challenged larvae. The *x*-axis represents the observation period expressed as days post-infection (dpi). The *y*-axis represents Log_{10} of RNA1 copy numbers (LCN) detected in 20 ng of total RNA. Results from bath infected larvae are depicted as green circles, while from larvae fed on NNV-exposed rotifers results are depicted as purple squares. Mean LCN values of the three replicates, per time point, are reported as short horizontal lines. A dashed horizontal line indicates the limit of quantification (LoQ). * Indicates the achievement of total mortality in both challenges.

highly variable results during the first 15 dpi. This is most likely due to the different sensitivity of the applied methods, the low prevalence of positive subjects in this time frame, and the number of sampled specimens. It can also be stated that water-borne infection resulted in faster viral replication within a narrower period than by the oral infection route. The latter initially seemed to have low efficiency, resulting in asynchronous and time-lapse replication events in the larvae. Heterogeneous results shed light on the importance of the sampling size, regardless of the infection route, in order to gain a suitable representation of the population, especially during the initial phases of the infection. Despite the low oral infection rate, viral replication and shedding from infected individuals were sufficient to trigger infection in the remaining members of the population. In bath infected fish, clinical signs and histopathological findings were observed earlier than in larvae orally challenged, which might be due to the different intake of rotifers by each larva, the heterogeneity in the number of infective particles contained by each rotifer, and to the possible degradation of viral particles during the digestion process in larvae digestive tract.

The horizontal transmission routes assayed in this study demonstrated the high susceptibility to NNV of 12 dph sea bass larvae, which still do not possess a fully functional immune system (28, 29). As a matter of fact, the oral transmission indicated that viral particles contained within rotifers maintained their infectivity and virulence, showing from 15 dpi a replication kinetic comparable with that obtained in the bath infection. Rotifers (*B. plicatilis*) and the crustacean *Artemia* sp. are the most common marine invertebrates used to feed marine fish larvae. Previous studies have shown that other rotifer species (*Brachionus urceus*) can efficiently transmit white spot syndrome virus (WSSV) to crayfish (*Procambarus clarkii*) and to shrimp as *Penaeus monodon* and *Fenneropenaeus chinensis* (30–32), or act as mechanical vectors of the Covert Mortality Nodavirus (CMNV) in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) ponds (33). *Artemia salina* was also demonstrated to transmit NNV infective particles to Senegalese sole larvae, leading to high mortality and clinical signs similar to the bath infection (19). Both *B. plicatilis* and *Artemia salina* are filter feeders, able to internalize viruses or bacteria suspended in the water, including viral particles attached to the phytoplankton following the phytoplankton-adhesion route (30). Similar to NNV location in *Artemia* individuals (19), we identified the presence of RGNNV particles in rotifers through IFAT and IHC. Virus antigens were mainly localized in the corona and the masticatory organ (34), in the intestine lumen, and on the inner side of the cuticula. This localization could be due to the internalization of viral particles in the intestine through the masticatory organ. Once there,

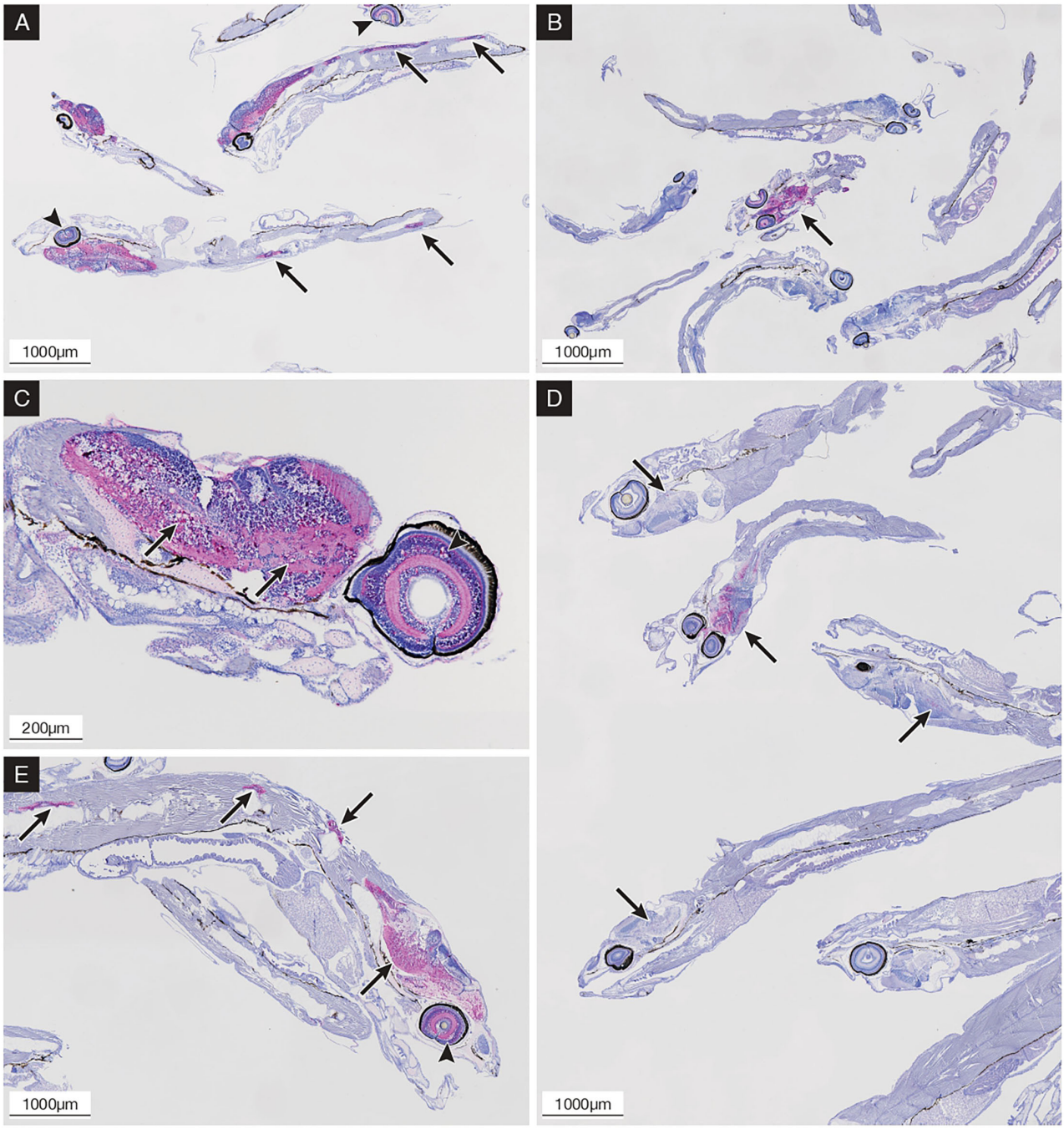


FIGURE 6 | Immunohistochemical (IHC) staining of sea bass larvae challenged *via* the oral route **(B,D,E)** and by bath **(A,C)** at different time points; the presence of betanodavirus antigens was revealed in bright red color. **(A)** 9 dpi; bath challenged larvae showing diffuse central nervous system (CNS) and retina (arrowheads) IHC staining and CNS vacuolization; positive spinal cord highlighted with arrows. **(B)** 9 dpi; orally infected larvae showing single positive specimens with intense IHC staining in the CNS (arrow) and retina. **(C)** 10 dpi; bath challenged larvae showing diffuse IHC staining and vacuolization in the encephalon (arrows) and retina (arrowhead). **(D)** 17 dpi; orally infected larvae showing positive specimens with variable intensity of IHC staining in the encephalon (arrows). **(E)** 21 dpi; orally infected larvae showing diffuse IHC staining and vacuolization in the encephalon, spinal cord (arrows), and retina (arrowhead).

viral particles could pass through the peritrophic membrane, diffuse in the perivisceral fluid of the pseudocoelom, and attach to the cuticle on the inner surface. Although the interaction and attachment of NNV with rotifer cells remain unknown, WSSV was shown to adhere to rotifer cell membranes (31). In addition, the visualization of IHC staining within the rotifer

body demonstrated the maintenance of NNV inside the rotifer at least up to 48 hpc. However, once NNV-exposed rotifers were placed in a virus-free environment, the presence of NNV started decreasing rapidly over time reaching a complete clearance at 6 dpc, both in terms of viable particles and detectable viral genomic RNA, suggesting that NNV accumulation into rotifers would be limited. Such evidence confirmed previous reports of viral clearance after 48 hpc and the role of some species of invertebrates as mechanical vectors in viral transmission (18).

Despite the fact that the virus is neither able to replicate nor be retained within rotifers for a long time, complete mortality was recorded in larvae orally challenged, highlighting the importance of not underestimating the role of these invertebrates in NNV transmission. In conclusion, our results indicate that NNV particles present in marine water can be transmitted to fish larvae using rotifers as mechanical vectors. Infected fish developed typical disease signs and suffered 100% mortality as in a bath infection. The final viral load was similar in fish infected by both routes, although a delay in viral replication of approximately 10 days was observed in the orally infected sea bass. In addition, it cannot be ruled out the role of phytoplankton as an intermediate vector for rotifer to larvae transmission as already experimentally demonstrated (30, 35, 36). These results highlight the importance of establishing routine controls on the live feed in order to prevent NNV horizontal transmission and to maintain the fish stock in adequate conditions for proper performance.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The original contributions presented in the study are included in the article/**Supplementary Material**, further inquiries can be directed to the corresponding author/s.

ETHICS STATEMENT

The animal study was reviewed and approved by Italian Ministry of Health Authorization No. 1018/2020-PR.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

LV-S, FP, and AM performed animal infection experiment. MA and LB performed molecular test. LV-S and AB performed virological test and IFAT. TP and EM performed histological test. IB and AT supervised the writing. AT gathered funds. All authors read and approved the final manuscript.

FUNDING

The research leading to these results has received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation program under Grant Agreement No. 731014 (VetBioNet project).

ACKNOWLEDGMENTS

Technicians of the Department of Histopathology (IZSVe—SCS3) are kindly acknowledged for their technical support in larvae inclusion, trimming, and immunostaining.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fvets.2022.932327/full#supplementary-material

REFERENCES

1. Bandín I, Souto S. Betanodavirus and VER disease: a 30-year research review. *Pathogens.* (2020) 9:106. doi: 10.3390/pathogens9020106
2. Mori KI, Nakai T, Muroga K, Arimoto M, Mushiake K, Furusawa I. Properties of a new virus belonging to nodaviridae found in larval striped jack (*Pseudocaranx dentex*) with nervous necrosis. *Virology.* (1992) 187:368–71. doi: 10.1016/0042-6822(92)90329-N
3. Sommerset I, Skern R, Biering E, Bleie H, Fiksdal IU, Grove S, et al. Protection against Atlantic halibut nodavirus in turbot is induced by recombinant capsid protein vaccination but not following DNA vaccination. *Fish Shellfish Immunol.* (2005) 18:13–29. doi: 10.1016/j.fsi.2004.03.006
4. Iwamoto T, Mise K, Takeda A, Okinaka Y, Mori KI, Arimoto M, et al. Characterization of striped jack nervous necrosis virus subgenomic RNA3 and biological activities of its encoded protein B2. *J Gen Virol.* (2005) 86:2807–16. doi: 10.1099/vir.0.80902-0
5. Nishizawa T, Furuhashi M, Nagai T, Nakai T, Muroga K. Genomic classification of fish nodaviruses by molecular phylogenetic analysis of the coat protein gene. *Appl Environ Microbiol.* (1997) 63:1633–6. doi: 10.1128/aem.63.4.1633-1636.1997
6. Toffolo V, Negrisolo E, Maltese C, Bovo G, Belvedere P, Colombo L, et al. Phylogeny of betanodaviruses and molecular evolution of their RNA polymerase and coat proteins. *Mol Phylogenet Evol.* (2007) 43:298–308. doi: 10.1016/j.ympev.2006.08.003
7. Olveira JG, Souto S, Dopazo CP, Thiéry R, Barja JL, Bandín I. Comparative analysis of both genomic segments of betanodaviruses isolated from epizootic outbreaks in farmed fish species provides evidence for genetic reassortment. *J Gen Virol.* (2009) 90:2940–51. doi: 10.1099/vir.0.013912-0
8. Panzarin V, Fusaro A, Monne I, Cappellozza E, Patarnello P, Bovo G, et al. Molecular epidemiology and evolutionary dynamics of betanodavirus in southern Europe. *Infect Genet Evol.* (2012) 12:63–70. doi: 10.1016/j.meegid.2011.10.007
9. Toffan A, Pascoli F, Pretto T, Panzarin V, Abbadi M, Buratin A, et al. Viral nervous necrosis in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) caused by reassortant betanodavirus RGNNV/SJNNV: an emerging threat for Mediterranean aquaculture. *Sci Rep.* (2017) 7:1–12. doi: 10.1038/srep46755
10. Doan QK, Vandeputte M, Chatain B, Morin T, Allal F. Viral encephalopathy and retinopathy in aquaculture: a review. *J Fish Dis.* (2016) 40:717–42. doi: 10.1111/jfd.12541
11. Gomez DK, Baeck GW, Kim JH, Choresca CH, Park SC. Molecular detection of betanodaviruses from apparently healthy wild marine invertebrates. *J Invertebr Pathol.* (2008) 97:197–202. doi: 10.1016/j.jip.2007.10.012
12. Gomez DK, Dong JL, Gun WB, Hee JY, Nam SS, Hwa YY, et al. Detection of betanodaviruses in apparently healthy aquarium fishes and invertebrates. *J Vet Sci.* (2006) 7:369–74. doi: 10.4142/jvs.2006.7.4.369
13. Bitchava K, Chassalevris T, Lampou E, Athanassopoulou F, Economou V, Dovas CI. Occurrence and molecular characterization of betanodaviruses in fish and invertebrates of the Greek territorial waters. *J Fish Dis.* (2019) 00:1–11. doi: 10.1111/jfd.13098
14. Volpe E, Grodzki M, Panzarin V, Guercio A, Purpari G, Serratore P, et al. Detection and molecular characterization of betanodaviruses retrieved from bivalve molluscs. *J Fish Dis.* (2018) 41:603–11. doi: 10.1111/jfd.12759

15. Kim YC, Kwon WJ, Min JG, Jeong HD. Isolation and initial characterization of new betanodaviruses in shellfish. *Transbound Emerg Dis.* (2018) 65:1557–67. doi: 10.1111/tbed.12900
16. Fichi G, Cardeti G, Perrucci S, Vanni A, Cersini A, Lenzi C, et al. Skin lesion-associated pathogens from *Octopus vulgaris*: first detection of *Photobacterium swingsii*, *Lactococcus garvieae* and betanodavirus. *Dis Aquat Organ.* (2015) 115:147–56. doi: 10.3354/dao02877
17. Johnstone C, Pérez M, Arizcun M, García-Ruiz C, Chaves-Pozo E. Reservoirs of red-spotted grouper nervous necrosis virus (RGNNV) in squid and shrimp species of Northern Alboran Sea. *Viruses.* (2022) 14:328. doi: 10.3390/v14020328
18. Skliris GP, Richards RH. Assessment of the susceptibility of the brine shrimp *Artemia salina* and rotifer *Brachionus plicatilis* to experimental nodavirus infections. *Aquaculture.* (1998) 169:133–41. doi: 10.1016/S0044-8486(98)00330-5
19. Vázquez-Salgado L, Olveira JG, Dopazo CP, Bandín I. Role of rotifer (*Brachionus plicatilis*) and Artemia (*Artemia salina*) nauplii in the horizontal transmission of a natural nervous necrosis virus (NNV) reassortant strain to Senegalese sole (*Solea senegalensis*) larvae. *Vet Q.* (2020) 40:205–14. doi: 10.1080/01652176.2020.1810357
20. Iwamoto T, Nakai T, Mori K, Arimoto M, Furusawa I. Cloning of the fish cell line SSN-1 for piscine nodaviruses. *Dis Aquat Organ.* (2000) 43:81–9. doi: 10.3354/dao043081
21. Reed LJ, Muench H, A. simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am J Hyg.* (1938) 27:493–7. doi: 10.1093/oxfordjournals.aje.a118408
22. Toffan A, Biasini L, Pretto T, Abbadi M, Buratin A, Franch R, et al. Age dependency of RGNNV/SJNNV viral encephalo-retinopathy in Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture.* (2021) 539:736605. doi: 10.1016/j.aquaculture.2021.736605
23. Panzarin V, Toffan A, Abbadi M, Buratin A, Mancin M, Braaen S, et al. Molecular basis for antigenic diversity of genus Betanodavirus. *PLoS ONE.* (2016) 11:e0158814. doi: 10.1371/journal.pone.0158814
24. Breuil G, Bonami JR, Pepin JF, Pichot Y. Viral infection (picorna-like virus) associated with mass mortalities in hatchery-reared sea-bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae and juveniles. *Aquaculture.* (1991) 97:109–16. doi: 10.1016/0044-8486(91)90258-9
25. Le Breton A, Grisez L, Sweetman J, Ollevier F. Viral nervous necrosis (VNN) associated with mass mortalities in cage-reared sea bass, *Dicentrarchus labrax (L). J Fish Dis.* (1997) 20:145–51. doi: 10.1046/j.1365-2761.1997.00284.x
26. Vendramin N, Toffan A, Mancin M, Cappellozza E, Panzarin V, Bovo G, et al. Comparative pathogenicity study of ten different betanodavirus strains in experimentally infected European sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L). *J Fish Dis.* (2014) 37:371–83. doi: 10.1111/jfd.12117
27. Lampou E, Dovas C, Margaroni M, Chasalevris T, Pappas IS, Dotsika E, et al. Investigation of routes of entry and dispersal pattern of RGNNV in tissues of European sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *J Fish Dis.* (2020) 43:1363–71. doi: 10.1111/jfd.13215
28. Breuil G, Vassiloglou B, Pepin JF, Romestand B. Ontogeny of IgM-bearing cells and changes in the immunoglobulin M-like protein level (IgM) during larval stages in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Fish Shellfish Immunol.* (1997) 7:29–43. doi: 10.1006/fsim.1996.0061
29. Scapigliati G, Romano N, Buonocore F, Picchietti S, Baldassini MR, Prugnoli D, et al. The immune system of sea bass, *Dicentrarchus labrax*, reared in aquaculture. *Dev Comp Immunol.* (2002) 26:151–60. doi: 10.1016/S0145-305X(01)00057-X
30. Zhang JS, Dong SL, Tian XL, Dong YW, Liu XY, Yan DC. Studies on the rotifer (*Brachionus urceus* Linnaeus, 1758) as a vector in white spot syndrome virus (WSSV) transmission. *Aquaculture.* (2006) 261:1181–5. doi: 10.1016/j.aquaculture.2006.09.002
31. Yan DC, Dong SL, Huang J, Zhang JS. White spot syndrome virus (WSSV) transmission from rotifer inoculum to crayfish. *J Invertebr Pathol.* (2007) 94:144–8. doi: 10.1016/j.jip.2006.09.005
32. Corre V, Faisan J, Carton-Kawagoshi RJ, Elle BJ, Traifalgar RF, Caipang CM. Evidence of WSSV transmission from the rotifer (*Brachionus plicatilis*) to the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) postlarvae and means to control rotifer resting eggs using industrial disinfectants. *Aquac Aquarium Conserv Legis Int J Bioflux Soc.* (2012) 5:64–8. Available online at: http://hdl.handle.net/10862/2947
33. Liu S, Wang X, Xu TT Li X, Du L, Zhang Q. Vectors and reservoir hosts of covert mortality nodavirus (CMNV) in shrimp ponds. *J Invertebr Pathol.* (2018) 154:29–36. doi: 10.1016/j.jip.2018.03.011
34. Kotikova E, Raikova O, Reuter M, Gustafsson M. Rotifer nervous system visualized by FMRFamide and 5-HT immunocytochemistry and confocal laser scanning microscopy. *Hydrobiologia.* (2005) 546:239–48. doi: 10.1007/s10750-005-4203-5
35. da Silva SMBC, Lavander HD, de Santana Luna MM, de Melo Eloi da Silva AO, Gálvez AO, Coimbra MRM. Artemia franciscana as a vector for infectious myonecrosis virus (IMNV) to *Litopenaeus vannamei* juvenile. *J Invertebr Pathol.* (2015) 126:1–5. doi: 10.1016/j.jip.2015.02.001
36. Zhang JS, Dong SL, Dong YW, Tian XL, Cao YC, Li ZJ, Yan DC. Assessment of the role of brine shrimp *Artemia* in white spot syndrome virus (WSSV) transmission. *Vet Res Commun.* (2010) 34:25–32. doi: 10.1007/s11259-009-9329-x

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2022 Vázquez-Salgado, Pascoli, Marsella, Biasini, Buratin, Pretto, Abbadi, Melchiotti, Bandín and Toffan. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Taylor & Francis Online

Log in | Register

Veterinary Quarterly ›
Volume 40, 2020 - Issue 1

Open access

1,145 Views | 3 CrossRef citations to date | 2 Altmetric

Research Article

Role of rotifer (*Brachionus plicatilis*) and *Artemia* (*Artemia salina*) nauplii in the horizontal transmission of a natural nervous necrosis virus (NNV) reassortant strain to Senegalese sole (*Solea senegalensis*) larvae

L. Vázquez-Salgado, J. G. Olveira, C. P. Dopazo & I. Bandín

Pages 205-214 | Received 03 Apr 2020, Accepted 11 Aug 2020, Accepted author version posted online: 19 Aug 2020, Published online:03 Sep 2020

Download citation https://doi.org/10.1080/01652176.2020.1810357 Check for updates

Ver PDF

Full Article Figures & data References Citations Metrics

© Licensing Reprints & Permissions PDF | EPUB

PDF Help

Reprints and Permissions

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons CC BY license, which permits unrestricted use, distribution, reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

You are not required to obtain permission to reuse this article in part or whole.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

VETERINARY QUARTERLY
2020, VOL. 40, NO. 1, 205–214
https://doi.org/10.1080/01652176.2020.1810357

Taylor & Francis
Taylor & Francis Group

OPEN ACCESS Check for updates

Role of rotifer (*Brachionus plicatilis*) and *Artemia* (*Artemia salina*) nauplii in the horizontal transmission of a natural nervous necrosis virus (NNV) reassortant strain to Senegalese sole (*Solea senegalensis*) larvae

L. Vázquez-Salgado, J. G. Olveira, C. P. Dopazo and I. Bandín

Instituto de Acuicultura, Departamento de Microbiología y Parasitología, Universidade de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain

ABSTRACT

Background: Marine invertebrates are provided as a first feed for marine fish larvae because of their strict nutritional requirements, despite also being a potential source of infectious agents.

Aim: To assess horizontal transmission of a nervous necrosis virus reassortant strain (NNV) to sole larvae via *Artemia* and rotifers.

Materials and methods: Rotifer (*Brachionus plicatilis*) and *Artemia* (*Artemia salina*) nauplii cultures were bath infected with a reassortant (RGNNV/SJNNV) NNV strain isolated from gilthead sea bream and viral internalisation was confirmed by IFA. Senegalese sole (*Solea senegalensis*) larvae were fed on infected *Artemia* and disease signs and mortality were recorded. In addition, NNV viability was checked in cultures of either unfed invertebrates or invertebrates fed on phytoplankton and in the supernatant of microalgae cultures. All samples were tested by RT-qPCR and inoculation in cell culture.

Results: Both rotifers and *Artemia* internalised NNV. Experimental transmission to sole larvae was achieved using infected *Artemia* and subsequently 60% mortality was recorded. At 24 h post-infection, orally infected individuals contained 9.34×10^4 copies of viral RNA, whereas the bath infection yielded 2.05×10^6 RNA copies larvae^{-1}. Viral presence in both invertebrates was detected up to 8 days post infection but viral load decreased over time. Feeding with microalgae decreased viral detection even more and microalgae supernatants were demonstrated to significantly affect NNV viability.

Conclusions: Our results demonstrate that both invertebrates can bioaccumulate NNV and that Senegalese sole larvae fed on infected *Artemia* might develop viral encephalopathy and retinopathy and high mortality.

ARTICLE HISTORY
Received 3 April 2020
Accepted 11 August 2020

KEYWORDS
Antiviral activity; *Artemia salina*; *Brachionus plicatilis*; horizontal transmission; mortality; nervous necrosis virus; rotifer; Senegalese sole larvae; *Solea senegalensis*

1. Introduction

Disease outbreaks are the main threat to finfish and shellfish production in aquaculture hatcheries, resulting in major economic losses. It is therefore essential to increase our understanding of the aetiology of these outbreaks and to develop prophylactic measures to prevent the appearance of potentially pathogenic agents in these facilities.

Nowadays, cultured juvenile and adult fish are fed on commercial diets, mostly dry or semi-moistened pellets, which supply the nutrients and energy required to meet the physiological needs of growing animals in a safe manner (Hixson 2014). However, the strict food requirements of marine fish at early larval stages are not met by artificial feeding and, therefore, live food, consisting of marine invertebrates (zooplankton) such as rotifers or the brine shrimp, *Artemia salina*, enriched with microalgae, provide fish larvae with the essential nutrients for adequate development (Dhont et al. 2013; Eryalçın 2018, 2019). Although these invertebrates are a source of essential biomolecules, they can also act as pathogen vectors for healthy cultures, transmitting parasites, bacteria and viruses to the next link in the food web (Marcogliese 2002; Avila-Villa et al. 2011; Valverde et al. 2019), as demonstrated by the detection of the same bacterial population in fish guts and in live food (Turgay et al. 2020).

One of the most serious diseases affecting marine aquaculture is viral encephalopathy and retinopathy (VER) also known as viral nervous necrosis (VNN), caused by the nervous necrosis virus (NNV)—Genus *Betanodavirus*, Family *Nodaviridae*. NNV is a non-enveloped virus, composed of two molecules of single-stranded positive-sense RNA, namely RNA1 and RNA2 (Nagai and Nishizawa 1999). The current

CONTACT I. Bandín isabel.bandin@usc.es Instituto de Acuicultura, Departamento de Microbiología y Parasitología, Universidade de Santiago de Compostela, 15706 Santiago de Compostela, Spain

© 2020 The Author(s). Published by Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group.
This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

classification, based on a phylogenetic analysis of the T4 region in the RNA2 molecule, establishes four genotypes: barfin flounder nervous necrosis virus (BFNNV), red spotted grouper nervous necrosis virus (RGNNV), stripped jack nervous necrosis virus (SJNNV) and tiger puffer nervous necrosis virus (TPNNV) (Nishizawa et al. 1997). In addition, RGNNV and SJNNV reassortants in both forms (RGNNV/SJNNV and SJNNV/RGNNV, RNA1/RNA2) have been isolated in Southern Europe from farmed sole (*Solea* sp.), European sea bass (*Dicenthrarchus labrax*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) (Bandín and Souto 2020). Betanodavirus transmission has been demonstrated to occur both horizontally and vertically (Doan et al. 2017; Bandín and Souto 2020). The horizontal route includes viral spreading through water during disease outbreaks, or by contact between infected fish or asymptomatic carriers and healthy susceptible animals. Several studies have suggested the possibility of non-fish carriers, reservoirs or vectors such as molluscs, crustaceans and rotifers, both in the wild and under farmed conditions (Skliris and Richards 1998; Gomez et al. 2006, 2008; Volpe et al. 2018).

The aim of this study was to assess whether a NNV reassortant strain (RGNNV/SJNNV) isolated from gilthead sea bream, could be transmitted through *Artemia* and rotifers to Senegalese sole larvae.

2. Materials and methods

2.1. Virus production and cell culture

A natural reassortant strain isolated from gilthead sea bream, with a RGNNV-type RNA1 and a SJNNV-RNA2, namely SpSaIAusc382.17 (hereafter 382.17), was propagated in E-11 cell line grown in L-15 medium containing 5% foetal bovine serum (FBS). Inoculated cells were maintained in L-15 medium supplemented with 2% FBS at 25 °C until the cytopathic effect (CPE) was complete. Then, the virus was clarified by centrifugation at 3000*g* for 15 min at 4 °C and stored at −80 °C until use. Viral titration was performed in 96-well plates incubated at 25 °C for 7–10 days. The plates were examined daily for the presence of CPE and the titres were expressed as 50% tissue culture infection dose per ml ($TCID_{50}$ ml^{-1}) (Reed and Muench 1938).

2.2. Rotifer and Artemia salina cultures and infection

Rotifer *Brachionus plicatilis* and brine shrimp *Artemia salina* cysts were kindly provided by Stolt Sea Farm S.A (Galicia, Spain). Rotifer stock were kept under continuous culture with sterile natural sea water (33 g l^{-1}) and aeration, at a density of 80 rotifers ml^{-1}. Artemia cysts were hatched in sterile natural sea water with strong aeration at a density of 60 cysts ml^{-1} and harvested at naupliar stage (the first developmental stage) after 24 h, separating nauplii from unhatched and empty cysts. In both cases, cultures were maintained in 1 l glass bottles at 22 °C in an illuminated room using a photoperiod of 16:8 light and dark cycle.

Both rotifers and *Artemia* nauplii were bath-challenged in triplicate with the 382.17 NNV strain at a concentration of 10^5 $TCID_{50}$ ml^{-1} for 24 h. After this period, they were rinsed in sea water to remove viral particles attached to the surface of the body and the remaining viral load was quantified. So as not to add more variables to the experiment, sub-cultivation was then performed with no food supply for 7 days. The length of the challenge was conditioned by zooplankton survival under the described conditions. Samples of 1 ml (80 rotifers ml^{-1} and 60 *Artemia* ml^{-1}) were taken at 24 h, 3 and 7 days post rinsing (hpr and dpr, respectively), that is 48 h post infection (hpi), 4 and 8 days post infection (dpi). For comparative purposes, the invertebrates were fed once at 24 hpi with either *Nannochloropsis gaditana* or *Isochrysis galbana* cultures.

2.3. Sole infection challenges

Experimental infections in Senegalese sole (*Solea senegalensis*) larvae were performed in order to assess the invertebrates' role in the transmission of this virus. Fish were handled in strict accordance with good animal practices regarding independently feeding larval forms as defined by EU guidelines (directive 2010/63/UE). The protocol was approved by the Galician Committee for experimental animal welfare and by the Xunta de Galicia (Permit Id. 15004/13/002).

A total of 550 Senegalese sole larvae (30-days post hatch -dph-) were used in this study. After an acclimatisation period at 22 °C, 10 larvae were killed with a tricaine methanesulfonate overdose (MS-222, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) and tested for the presence of nervous necrosis virus (NNV). The oral challenge was carried out on three groups of sole larvae ($N = 80$) by adding a dose of 60 NNV-infected *Artemia* nauplii per larvae, that were infected as described above, and subcultivated for 48 h before being fed to the larvae. Another three groups ($N = 80$) were bath challenged for 3 h at a viral concentration of 10^5 $TCID_{50}$ ml^{-1}. In addition, two control tanks ($N = 30$) were set up, one for the bath infection and another for the oral infection. In the first, L-15 medium was used for mock infection and in the second fish were fed on non-infected *Artemia*. Seven larvae from each infected group were

randomly sampled at 24, 72 hpi, 5 and 9 dpi. Larvae were observed twice a day and symptomatology and mortality were recorded. Both challenge experiments were terminated at 12 dpi. The sampled larvae, as well as the survivors, were euthanized as previously described. All the larvae were subjected to virological analysis and quantification of the viral load.

An oral challenge with an identical number of first feeding larvae (2 dph) and infected rotifers was also attempted. Unfortunately, sole larvae fed on them did not survive in our aquarium facilities enough time to complete the experiment.

2.4. Zooplankton immunofluorescence assay (IFA)

Infected zooplankton was cultivated as described above with no food supply for 72 h. Afterwards, they were fixed as follows: rotifers were incubated in paraformaldehyde 4% for 5 min, permeabilised as described above and blocked with skimmed milk (0.5% w/v) for 10 min (Kang et al. 2018). *Artemia* nauplii were fixed overnight in paraformaldehyde 4% (Panreac, Barcelona, Spain) at 4 °C, washed with 0.1% (v/v) Tween-80–phosphate-buffered saline (PBS), permeabilised with 0.1% (v/v) Triton X-100–PBS and blocked with skimmed milk (30% w/v for 30 min) (Cano et al. 2009). Finally, fixed invertebrates were incubated for 1 h with anti-NNV (ab26812–abcam) solution (ratio 1:10) and AntiRabbit IgG-FITC, and fluorescence was observed using an Eclipse T-2000 U inverted microscope (Nikon, Tokyo, Japan).

2.5. Microalgae culture and viral infection

N. gaditana (CCMP 526) and *I. galbana* (CCAP 927/20) were grown in natural, autoclaved and filtered sea water, and supplemented with GoldMedium (Aqualgae), following the manufacturer's instructions. Cultures were maintained at 22 °C and 5400 lx light intensity, under a 16:8 light and dark photoperiod. Both microalgae cultures were started in test tubes (80 ml) and increased to 1 l glass bottles, at a density of 5×10^6 cells ml^{-1} until reaching the stationary phase, which was used for zooplankton feeding. Microalgae culture growth was determined using a Neubauer counting chamber each day.

To assess the effect of microalgae water culture on viral viability, 50 ml of microalgae cultures at stationary phase were centrifuged at 4000*g* for 10 min, and the 382.17 strain was incubated in the supernatant at 25 °C. Triplicate samples were taken at 24, 72 h and 6 days of incubation and titrated as described above.

2.6. Sample processing and RNA extraction

Samples of whole *Artemia* and rotifers, and samples of larvae head (brain tissue and eyes) were tested for the presence of Betanodavirus. Pooled samples were homogenized with Earle's balanced salt solution (Hyclone Laboratories Inc., Logan, Utah, USA) supplemented with antibiotics (amphotericin B 200 µg ml^{-1}, gentamycin 500 µg ml^{-1}, penicillin 1000 units ml^{-1} and streptomycin 1000 units ml^{-1}) using a Tissue Master 125 (OMNI International, Kennesaw, Georgia, USA). After centrifugation of the homogenates at 2000*g* for 20 min at 4 °C, the supernatants were transferred to new tubes and incubated for 6 h at room temperature. Next, supernatants were inoculated (diluted at 10^{-1} and 10^{-2}) in duplicate onto 48-well plates of semiconfluent E-11 monolayers. Infected cells were incubated at 25 °C and examined daily for the presence of CPE. After 10 days, positive and negative samples were subcultivated (by inoculating 100 µl of the scraped cell suspension onto new cultures) for 15 days.

2.7. Viral quantification by reverse transcription real-time PCR

Betanodavirus RNA was extracted using Nucleospin® RNA (Macherey-Nagel, Duren, Germany) following the manufacturer's instructions and reverse transcribed using a *RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit* (Thermoscientific Inc., Vilnius, Lithuania) in a thermocycler *MyCycler*™ (Bio-Rad, Hercules, California, USA). Briefly, cDNA was synthesized in the presence of random primers (200 nM) at 42 °C for 1 h, followed by enzyme inactivation at 70 °C for 10 min. The viral load in each sample was quantified by qPCR reactions carried out in a final volume of 20 µl, containing 2 µl of cDNA, 10 µl of iQ™ SYBR® Green Supermix (Bio-Rad) and 200 nM of SnodR1 F/R primers (Olveira et al. 2013). Amplification was performed in a CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Biorad). After an initial denaturation and enzyme activation at 95 °C for 3 min, the mixture was subjected to 40 cycles of amplification (denaturation for 15 s at 95 °C, annealing-extension for 20 s at 59 °C). Quantifications were accomplished using a standard curve generated with 20-fold dilutions of SpSsIAusc160.03 RNA1 prepared from 2.91×10^{-7} RNA copies ml^{-1} up to 2.27×10^{-2} RNA copies ml^{-1} in nuclease-free water.

2.8. Statistical analysis

Statistical analyses were carried out using GraphPad Prism 8.1 (San Diego, California, USA). Viral quantification ($TCID_{50}$ and RNA1 copies) data were analysed by two-way ANOVA and Tukey correction, and

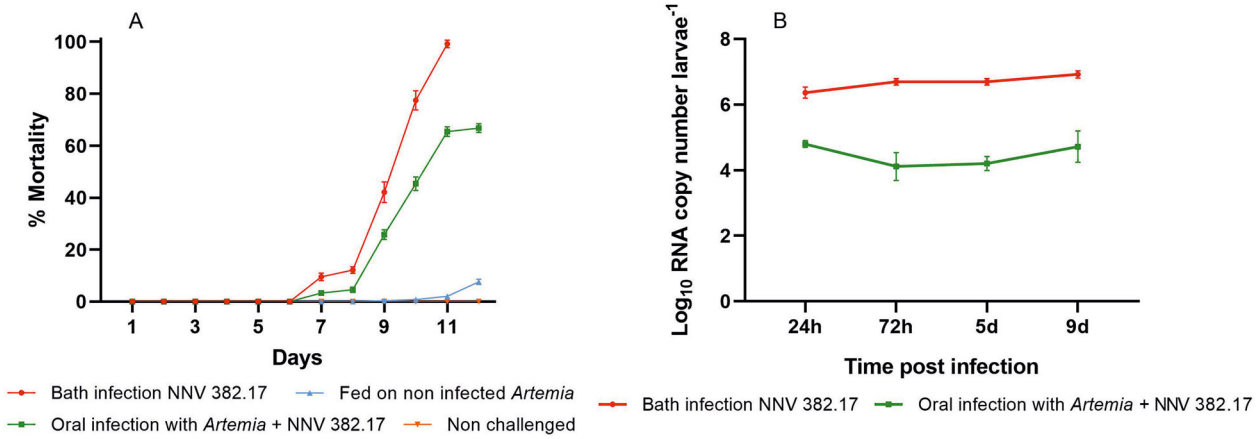


Figure 1. Mortality observed in the Senegalese sole larvae infected with NNV 382.17 (A) red: immersion challenge; green: oral challenge with *Artemia* carrying NNV; blue: sole fed with non-infected *Artemia*; orange: sole larvae control, and viral load quantified in sole (B) waterborne infected (red) and fed with *Artemia* carrying NNV (green). Data are presented as mean ± SD ($n = 3$).

mortality analyses were undertaken with survival tables using the Kaplan–Meyer test. To determine significative differences between groups the Log-rank (Mantel–Cox) test was performed. $p < 0.05$ was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Immersion and oral challenges in sole larvae

First mortalities (4% and 12% in oral and bath infection, respectively) were recorded at day 7 post infection (pi) in both challenges, reaching 27% in sole larvae fed with *Artemia* carrying NNV and 45% in the bath-infected individuals on day 9 pi. Mortality peaked at 11 dpi, with a cumulative mortality of 66% and 100% in the oral and bath infection, respectively (Figure 1(A)). In addition, an abnormal swimming pattern was first observed in bath challenged larvae at 9 dpi, whereas in the oral infection it was observed one day later. Neither signs of disease nor deaths were observed in the bath control. Although a slight mortality (9%) was detected in the fish fed with non-infected *Artemia*, all individuals were asymptomatic and NNV was not detected in these larvae. Mortality curves in the challenged larvae were significantly different from the control group according to the Log-rank (Mantel–Cox) test (p value 0.0003).

Regarding the viral load at 24 hpi, orally infected individuals contained 9.34×10^4 copies of viral RNA larvae^{-1}, whereas the bath infection yielded 2.05×10^6 RNA copies larvae^{-1} (Figure 1(B)), representing a difference of 1.34 logs. Despite mortality rates increasing over time, the number of NNV RNA copies detected in sampled larvae did not show significant variations (8.97×10^4 and 9.33×10^6 at 9 dpi for oral and bath challenge, respectively) and the difference between both routes of infection remained constant. The viral load quantified in the dead larvae from both oral and bath challenge (3.19×10^5 and 1.67×10^7 at 7 dpi and 4.82×10^5 and 4.90×10^7 at 11 dpi) was similar to that observed in the sampled fish. The number of RNA copies in the survivors of the oral challenge did not show differences with that obtained from larvae sampled at 9 dpi.

3.2. IFA detection of NNV in A. salina nauplii and rotifers

In *Artemia*, specific fluorescence was mainly localised in the head region. At this larval stage, the nauplius eye (NE) is already differentiated (Figure 2(A)) (Wildt and Harzsch 2002) but no virus was observed in it (Figure 2(B)). Fluorescence was concentrated behind the NE (Figure 2(C)) where cells forming the compound eye (CE) are located (Criel and Macrae 2002; Wildt and Harzsch 2002). To a lesser extent, it was also detected all along the animal, probably due to unspecific antibody binding to the chitinous exoskeleton.

In rotifers, fluorescence was concentrated in the anterior region (Figure 3(B)) where the corona (C), the masticatory organ (M) and cerebral ganglia (CG) (Figure 3(A)) are located (Boell and Bucher 2008) and, to a lesser extent, in the perivisceral fluid along the whole body.

3.3. NNV quantification in rotifers and A. salina nauplii

NNV RNA was detected in the infected zooplankton until the end of the experiment (8 dpi). At 24 hpi, the mean RNA copy number was 1.52×10^6 ml^{-1} in rotifers and 2.88×10^5 ml^{-1} in *Artemia* and no significant differences were observed when

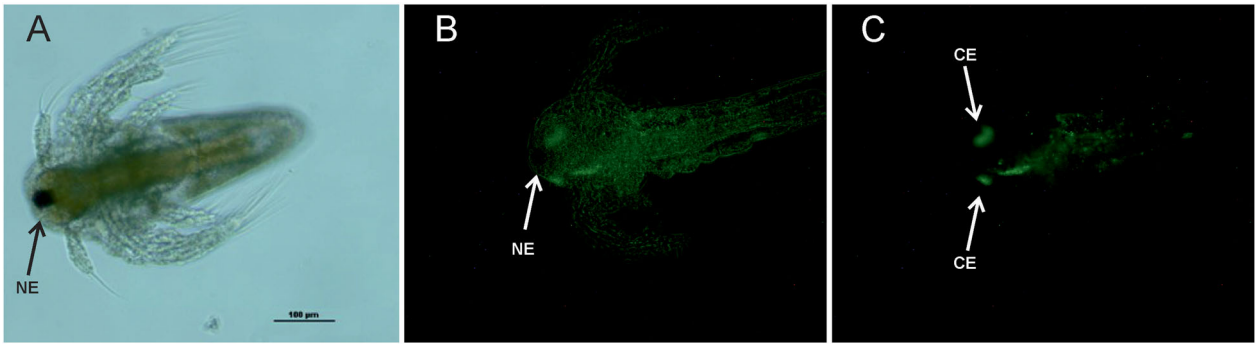


Figure 2. Immunofluorescence staining of *Artemia* nauplii infected with NNV 382.17 for 24 h and cultivated in sterile sea water for 48 h; bright light (A), FITC fluorescence and bright light (B), FITC fluorescence (C). Scale bar indicates 100 µm. NE: nauplius eye, CE: preliminary cells forming the compound eyes.

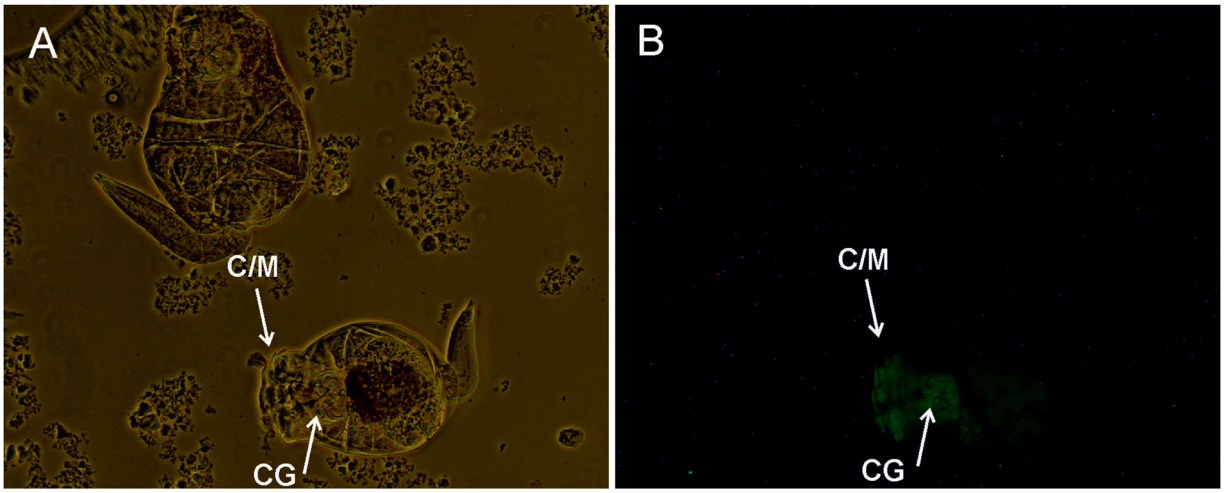


Figure 3. Immunofluorescence staining of rotifers infected with NNV 382.17 for 24 h and cultivated in sterile sea water for 48 h, bright light image of two female rotifers (A) and fluorescence observed in one of them (B). C/M: corona and masticatory organ; CG: cerebral ganglia.

compared with the inoculum (p value > 0.05). At 48 hpi, a non-significant increase (5.71×10^6 in rotifers and 7.46×10^5 in *Artemia* samples, p value > 0.05) was detected (Figure 4). Although at 4 dpi, a significant reduction in the number of NNV RNA copies was observed (1.32×10^5 in rotifers and 6.78×10^4 in *Artemia*; p value < 0.05), at 8 dpi, the viral load inside the invertebrates was still moderate (1.92×10^4 in rotifers and 1.97×10^4 in *Artemia*). The virus was recovered in cell culture at 24 and 48 hpi from rotifers and up to 4 dpi from *Artemia*.

No alterations in the swimming behaviour were observed in any of the invertebrates, suggesting that they were not suffering from neurological damage. However, from day 4 pi onwards, some mortality was observed in both invertebrates, which was attributed to the effects of starvation. Therefore, three new infection assays were performed in triplicate using invertebrates both unfed and fed either with *N. gaditana* or *I. galbana*, in order to study if the reduction in viral load was related to zooplankton mortality. As occurred in the previous experiment, at 24 hpi the viral load (3.95×10^5) was similar to the inoculum in the unfed *Artemia* nauplii, and

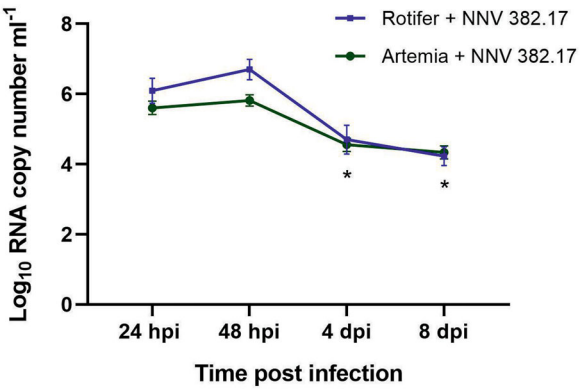


Figure 4. Viral load quantified into *Artemia* nauplii (green) and rotifer (blue) waterborne infected with NNV 382.17 with no food supply. Data presented as mean ± SD ($n = 3$). Asterisks show significant differences compared to the 24 hpi samples (*p value < 0.05).

a non-significant increase (0.41 logs; p value > 0.05) was observed at 48 hpi. However, when fed on *N. gaditana* and *I. galbana*, there was a decrease of 1.34 and 1.27 logs, respectively (p value 0.0007) (Figure 5(A)). Finally, at 8 dpi, a significant decrease in the number of NNV RNA copies compared to the 24 hpi samples was observed (p value 0.0001) and

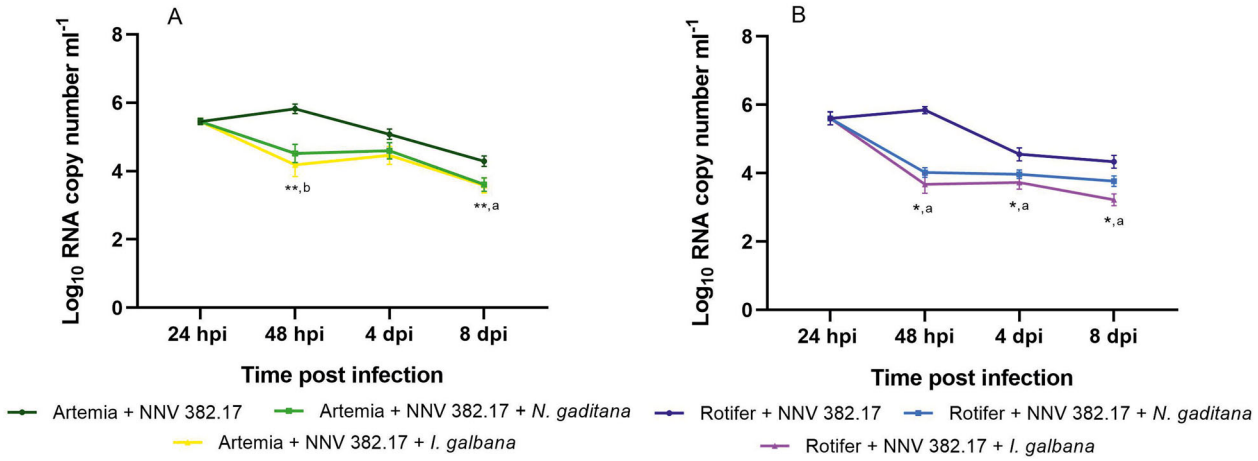


Figure 5. Viral load quantified in *Artemia* (A) waterborne infected for 24 h when no food was added (dark green) and fed on *N. gaditana* (light green) and *I. galbana* (yellow), and in rotifers (B) with no food (dark blue) and fed on *N. gaditana* (light blue) and *I. galbana* (purple). Data presented are the mean values ± SD of three replicates. Asterisks indicate significant differences compared with the 24 hpi samples (*p value < 0.05, **p value < 0.001). Letters show significant differences with the unfed group at given time points (a, p value < 0.05, b, p value < 0.001).

the difference between the fed and unfed groups was 0.74 logs (p value < 0.05). Similar results were obtained in rotifer cultures, which carried an initial viral load of 1.46×10^5 copies ml^{-1} (Figure 5(B)). In the unfed groups, the RNA copy number showed a significant reduction at 4 dpi, which was maintained at 8 dpi (1.05 and 1.27 logs, respectively). However, the number of NNV RNA copies decreased significantly 24 h after being fed on *N. gaditana* (48 hpi) (1.58 logs; p value 0.0072), and an even higher reduction was observed after feeding with *I. galbana* (1.93 logs; p value 0.0441). The differences in the viral load between unfed and fed individuals were reduced at 4 dpi but increased significantly on day 8 pi in individuals fed with *I. galbana* with respect to the unfed ones (1.11 logs, p value 0.0036). The isolation of infective particles in cell culture was achieved from *Artemia* samples up to 48 hpi (from both fed and unfed individuals). However, when rotifer samples were analysed, viral recovery was only accomplished from unfed individuals at 24 hpi. No VER signs were observed in any of the challenged invertebrates.

Given that feeding the invertebrates with microalgae did not reduce the decrease in the viral load but rather increased it, we decided to investigate the effect of the microalgae culture on virus viability. To this end, 382.17 was incubated in *N. gaditana* and *I. galbana* water culture and the viral survival was compared with that in sea water. As expected, NNV incubation in sea water for 7 days did not result in a reduction in viral titre, but it was clearly reduced when incubated for 72 h in *N. gaditana* water culture (almost 2 logs, p value 0.0009) and even more so in the water obtained from *I. galbana* (more than 3.5 logs, p 0.0001) (Figure 6(A)). A similar effect was observed in the number of viral RNA copies with a reduction of 2.27 logs (p value 0.0002) 7 days after incubation with *I. galbana* water culture (Figure 6(B)), whereas *N. gaditana* caused a non-significant reduction (0.59 logs; p value 0.1239).

4. Discussion

Horizontal NNV transmission from fish to fish or through the water body, has been fairly demonstrated in a number of fish species (Bandín and Souto 2020). In addition, putative viral transmission to marine larval stages through live food (rotifers and brine shrimp) has been suggested (Skliris and Richards 1998). In the present report, successful horizontal NNV transmission and VER development has been achieved in Senegalese sole larvae fed with infected brine shrimp, *A. salina*.

The sole larvae (30 dph) were fed once with infected *Artemia* nauplii and NNV transmission was demonstrated after viral recovery from larval brain tissue. In addition, VER development was evidenced by larval abnormal swimming behaviour and a 66% recorded mortality. As expected, mortality and viral load were lower than in the bath challenge used as a positive control, probably due to the different ways the virus enters the host. Whereas NNV present in water can reportedly use gills, skin and the oral cavity as portals of entry to sole juveniles (Souto et al. 2018), through live food NNV can only get into the larvae using the digestive tract. Therefore, VER development in the sole larvae was probably triggered once NNV was released from the *Artemia* during the digestion process and finally reached larvae brain tissue either through the nervous or the circulatory systems (Bandín and Souto 2020). This experiment suggests that cell receptors responsible for viral attachment to brain and retina in adults are

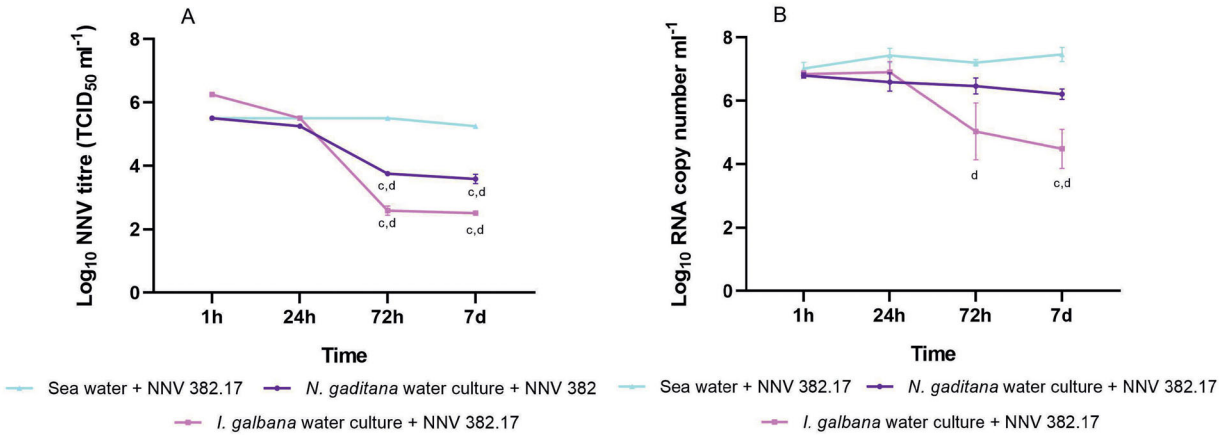


Figure 6. Viral quantification expressed as $TCID_{50}$ ml^{-1} (A) and RNA copies ml^{-1} (B) after incubating the 382.17 strain in microalgae water culture (purple: *N. gaditana*; pink: *I. galbana*) and in sea water (light blue). Data are presented as mean ± SD ($n = 3$). Letters indicate significant differences with the 24 h samples (c, p value < 0.001) and with sea water (d, p value < 0.001).

already present in 30 dph sole larvae as reported for other fish species, such as grouper (*Epinephelus* sp), striped jack (*Pseudocaranx dentex*), Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) and European sea bass (Mori et al. 1991; Nguyen et al. 1996; Grotmol et al. 1999; Breuil et al. 2002). Unfortunately, oral infection through rotifers, which are used as a first larval feed, was not successful because the appropriate larval stage (2–3 dph) did not survive in our aquarium facilities. However, NNV was detected in the rotifers up to 8 dpi, suggesting that these marine invertebrates could also act as viral vectors. Previous studies have reported the horizontal transmission of different pathogens through both invertebrates used as live food either in finfish or shellfish cultures. Rotifers have been reported to contain potential fish pathogenic bacteria (Turgay et al. 2020) and to transmit viral pathogens to shellfish, such as the White Spot Syndrome Virus (WSSV) to crayfish (*Procambarus clarkii*) and the black tiger shrimp, *Penaeus monodon* (Zhang et al. 2006; Yan et al. 2007; Corre et al. 2012), and the Covert Mortality Nodavirus (CMNV) to the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Liu et al. 2018). *Artemia* has also been demonstrated to transmit CMNV, *Baculovirus penaei* and Infectious Myonecrosis virus (IMNV) to the Pacific white shrimp (Overstreet et al. 1988, Silva et al. 2015; Liu et al. 2018), *Macrobachium rosembergii* nodavirus (MrNV) to giant freshwater prawn (Sudhakaran et al. 2006), and Lymphocystis disease virus (LCDV) to gilthead seabream larvae (Valverde et al. 2019).

Both rotifer and *Artemia* display a filter-feeding behaviour characterized by filtering non-selected particles smaller than 50 µm (Kiørboe 2011) which could lead to the accumulation of NNV particles and explain their role as NNV vectors. Our results demonstrate that NNV can be internalised and accumulated in both invertebrates after the immersion challenge. In rotifers, fluorescence was observed in the corona and the masticatory organ, where different neurons are connected (Kotikova et al. 2005), and in the cerebral ganglia. In *Artemia*, IFA results showed NNV attachment to the preliminary cells forming the adult compound eyes, located between the nauplius eye and the first antennae (Criel and Macrae 2002). The decrease in the viral load through the experimental course indicates that no viral replication is being produced, although infective viral particles were recovered in cell culture 48 hpi from rotifers and up to 4 dpi from *Artemia*. Despite this decrease, however, viral clearance was not achieved in any of the invertebrates, supporting their role as NNV-biological vectors. NNV accumulation has already being reported in bivalve molluscs (Volpe et al. 2017, 2018; Kim et al. 2018; Bitchava et al. 2019) and viral detection in other molluscs and crustaceans (Gomez et al. 2006, 2008; Fichi et al. 2015) suggests that marine invertebrates are also a potential source of NNV in the wild.

None of the challenged invertebrates showed typical VER symptomatology, like looping or resting belly up, as previously demonstrated by Skliris and Richards (Skliris and Richards 1998). The lack of symptoms in brine shrimp challenged with IMNV (Silva et al. 2015), WSSV (Li et al. 2003) and MrNV (Sudhakaran et al. 2006) has already been reported. Furthermore, the replication of LCDV at different growth stages of the invertebrate did not provoke disease symptoms (Valverde et al. 2019). However, in our challenge, mortality was recorded in both rotifers and *Artemia* 4 dpi onwards; this prompted us to perform additional experiments in order to assess whether mortality was due to viral accumulation or to the starvation effects on the invertebrates' body functions, as they were not fed during the challenge. In these new assays, the invertebrates were fed with microalgae after viral infection. Phytoplankton is broadly utilized in aquaculture as nutritional live food for zooplankton, providing them with docosahexaenoic acid (DHA), eicosapentaenoic acid (EPA) and free amino acids (FAA) among

others (Eryalçın 2018, 2019; Ferreira et al. 2018). *N. gaditana* and *I. galbana* are two of the most commonly used species (Hemaiswarya et al. 2011) and were therefore used as the food supply for our invertebrate cultures. Interestingly, the viral load in the fed groups was even lower than that of the unfed ones, regardless of the microalgae used, suggesting that feeding the invertebrates with both microalgae species has a negative impact on NNV viability. It has been demonstrated that several microalgae produce and release compounds with strong antibacterial and antiviral activity (Falaise et al. 2016), therefore, in order to check the secretion of any antiviral substances by the microalgae species used in this study, NNV was incubated for 7 days in the supernatant obtained after centrifuging *N. gaditana* and *I. galbana* cultures at the stationary phase and then viral survival was compared with that in seawater. NNV incubation in seawater did not result in any viral viability alteration as previously reported (Frerichs et al. 2000). However, both microalgae supernatants caused a significant reduction in the $TCID_{50}$ values (2 and 3.5 logs in the case of *N. gaditana* and *I. galbana*, respectively), but genomic values decreased only after incubation with *I. galbana*. These results indicate that although both microalgae can affect viral infectivity, different mechanisms must be involved in their inhibitory properties. As previously reported, microalgae metabolites can block viral adsorption/penetration (Hernández-Corona et al. 2002), but other steps of viral replication can also be affected (Huheihel et al. 2002). Studies are in progress to characterize the anti-NNV compound secreted by both microalgae and the mechanism involved in their antiviral activity.

On the other hand, the NNV reassortant strain used in this study was isolated from diseased gilthead seabream and turned out to be highly pathogenic to waterborne infected sole larvae (100% mortality), demonstrating that horizontal transmission between these two species is possible, as recently proved between gilthead sea bream and European sea bass, although causing low mortality in the second species (Volpe et al. 2020). So far, the RGNNV/SJNNV reassortant strains have only been isolated in Southern Europe, from both farmed and wild fish species (Toffolo et al. 2007; Olveira et al. 2009; Toffan et al. 2017; Bitchava et al. 2019; Volpe et al. 2020). Our results suggest that interspecies transmission could be involved in the spread of reassortant strains in the wild.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5. Conclusion

We have demonstrated that live food can be a vector of horizontal NNV spreading to *Solea senegalensis* larvae and that inter-species transmission of reassortant strains is possible. Although VER developed only in sole larvae orally challenged with infected *Artemia*, both rotifers and *Artemia* can be considered NNV vectors, therefore becoming a potential threat to aquaculture production. In addition, we have shown that feeding these invertebrates with both microalgae, but specially with *I. galbana,* not only provides them with the suitable biochemical composition to become a proper feed for optimal fish larvae growth, survival and normal development, but also gives them some protection against viral infections. All of these results can contribute to the development of prophylactic measures to be used in aquaculture hatcheries.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge Dra. Ana Otero for providing the microalgae cultures, Alicia A. Silva and Johnny Franqueira for sample processing, Nicolás Costa for his contribution to the rotifer infections, Stolt Sea Farm S.A. for supplying the fish larvae and zooplankton used in this study and John Souto for the English review.

Disclosure statement

The authors report no conflict of interest.

Funding

This work was partially supported by the Xunta de Galicia, (Spain) under Grant ED431C 2018/18. Our laboratory was also funded by the Interreg VA Spain-Portugal cooperation program (POCTEP) 2014-2020, 0474_BLUEBIOLAB project, co-funded by FEDER through the research contract awarded to L. Vázquez-Salgado.

References

Avila-Villa LA, Martínez-Porchas M, Gollas-Galvan T, López-Elías JA, Mercado L, Murguia-López V, Mendoza-Cano F, Hernandez-López J. 2011. Evaluation of different microalgae species and *Artemia* (*Artemia franciscana*) as possible vectors of necrotizing hepatopancreatitis bacteria. Aquaculture. 318(3–4):273–276.

Bandín I, Souto S. 2020. Betanodavirus and VER disease: a 30-year research review. Pathogens. 9(2):106.

Bitchava K, Chassalevris T, Lampou E, Athanassopoulou F, Economou V, Dovas CI. 2019. Occurrence and molecular characterization of betanodaviruses in fish and invertebrates of the Greek territorial waters. J Fish Dis. 42(12): 1773–1783.

Boell LA, Bucher G. 2008. Whole-mount in situ hybridization in the Rotifer *Brachionus plicatilis* representing a basal branch of Lophotrochozoans. Dev Genes Evol. 218(8):445–451.

Breuil G, Pépin J, Boscher S, Thiéry R. 2002. Experimental vertical transmission of nodavirus from broodfish to eggs and larvae of the sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.). J Fish Dis. 25(12):697–702.

Cano I, Lopez-Jimena B, Garcia-Rosado E, Ortiz-Delgado JB, Alonso MC, Borrego JJ, Sarasquete C, Castro D. 2009.

Detection and persistence of lymphocystis disease virus (LCDV) in *Artemia* sp. Aquaculture. 291(3–4):230–236.
Corre V, Faisan J, Carton-Kawagoshi RJ, Elle BJ, Traifalgar RF, Caipang CM. 2012. Evidence of WSSV transmission from the rotifer (*Brachionus plicatilis*) to the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) postlarvae and means to control rotifer resting eggs using industrial disinfectants. AACL Bioflux. 5(2):64–68.
Criel GRJ, Macrae TH. 2002. *Artemia* morphology and structure. In: Abatzopoulos J, Beardmore JA, Clegg JS, Sorgeloos P, editors. Artemia Basic Applied Biology. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers; p. 1–37.
Dhont J, Dierckens K, Støttrup J, Van Stappen G, Wille M, Sorgeloos P. 2013. Rotifers, *Artemia* and copepods as live feeds for fish larvae in aquaculture. In: Allan G, Burnell G, editors. Advances in Aquaculture Hatchery Technology. Cambridge: Woodhead Publishing Limited; p. 157–202.
Doan QK, Vandeputte M, Chatain B, Morin T, Allal F. 2017. Viral encephalopathy and retinopathy in aquaculture: a review. J Fish Dis. 40(5):717–742.
Eryalçın KM. 2018. Effects of different commercial feeds and enrichments on biochemical composition and fatty acid profile of rotifer (*Brachionus Plicatilis*, Müller 1786) and *Artemia Franciscana*. Turkish J Fish Aquat Sci. 18: 81–90. http://dx.doi.org/10.1016/j.seares.2013.04.014.
Eryalçın KM. 2019. Nutritional value and production performance of the rotifer *Brachionus plicatilis* Müller, 1786 cultured with different feeds at commercial scale. Aquacult Int. 27(3):875–890.
Falaise C, François C, Travers MA, Morga B, Haure J, Tremblay R, Turcotte F, Pasetto P, Gastineau R, Hardivillier Y, et al. 2016. Antimicrobial compounds from eukaryotic microalgae against human pathogens and diseases in aquaculture. Mar Drugs. 14(9):1–27.
Ferreira M, Cortina-Burgueño Á, Freire I, Otero A. 2018. Effect of nutritional status and concentration of *Nannochloropsis gaditana* as enrichment diet for the marine rotifer *Brachionus* sp. Aquaculture. 491(March):351–357.
Fichi G, Cardeti G, Perrucci S, Vanni A, Cersini A, Lenzi C, De Wolf T, Fronte B, Guarducci M, Susini F. 2015. Skin lesion-associated pathogens from *Octopus vulgaris*: first detection of *Photobacterium swingsii*, *Lactococcus garvieae* and betanodavirus. Dis Aquat Org. 115(2):147–156.
Frerichs GN, Tweedie A, Starkey WG, Richards RH. 2000. Temperature, pH and electrolyte sensitivity, and heat, UV and disinfectant inactivation of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) neuropathy nodavirus. Aquaculture. 185(1–2):13–24.
Gomez DK, Baeck GW, Kim JH, Choresca CH, Park SC. 2008. Molecular detection of betanodaviruses from apparently healthy wild marine invertebrates. J Invertebr Pathol. 97(3):197–202.
Gomez DK, Dong JL, Gun WB, Hee JY, Nam SS, Hwa YY, Cheol YH, Jun HP, Se CP. 2006. Detection of betanodaviruses in apparently healthy aquarium fishes and invertebrates. J Vet Sci. 7(4):369–374.
Grotmol S, Bergh Ø, Totland GK. 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(2):95–106.
Hemaiswarya S, Raja R, Kumar RR, Ganesan V, Anbazhagan C. 2011. Microalgae: a sustainable feed source for aquaculture. World J Microbiol Biotechnol. 27(8):1737–1746.
Hernández-Corona A, Nieves I, Meckes M, Chamorro G, Barron BL. 2002. Antiviral activity of *Spirulina maxima* against herpes simplex virus type 2. Antiviral Res. 56(3): 279–285.
Hixson SM. 2014. Fish nutrition and current issues in aquaculture: the balance in providing safe and nutritious seafood, in an environmentally sustainable manner. J Aquat Res Dev. 5(3):234.
Huheihel M, Ishanu V, Tal J, Arad S. 2002. Activity of *Porphyridium* sp. polysaccharide against herpes simplex viruses in vitro and in vivo. J Biochem Biophys Methods. 50(2–3):189–200.
Kang HM, Jeong CB, Kim MS, Lee JS, Zhou J, Lee YH, Kim DH, Moon E, Kweon HS, Lee SJ, Lee JS. 2018. The role of the p38-activated protein kinase signaling pathway-mediated autophagy in cadmium-exposed monogonont rotifer *Brachious koreanus*. Aquat Toxicol. 194:46–56.
Kim YC, Kwon WJ, Min JG, Jeong HD. 2018. Isolation and initial characterization of new betanodaviruses in shellfish. Transbound Emerg Dis. 65(6):1557–1567.
Kiørboe T. 2011. How zooplankton feed: mechanisms, traits and trade-offs. Biol Rev Camb Philos Soc. 86(2):311–339.
Kotikova E, Raikova O, Reuter M, Gustafsson M. 2005. Rotifer nervous system visualized by FMRFamide and 5-HT immunocytochemistry and confocal laser scanning microscopy. Hydrobiologia. 546(1):239–248.
Li Q, Zhang J, Chen Y, Yang F. 2003. White spot syndrome virus (WSSV) infectivity for *Artemia* at different developmental stages. Dis Aquat Org. 57(3):261–264.
Liu S, Wang X, Xu TT, Li X, Du L, Zhang Q. 2018. Vectors and reservoir hosts of covert mortality nodavirus (CMNV) in shrimp ponds. J Invertebr Pathol. 154:29–36.
Marcogliese DJ. 2002. Food webs and the transmission of parasites to marine fish. Parasitology. 124(7):83–99.
Mori KI, Nakai T, Nagahara M, Muroga K, Mekuchi T, Kanno T. 1991. A viral disease in hatchery-reared larvae and juveniles of redspotted grouper. Fish Pathol. 26(4):209–210.
Nagai T, Nishizawa T. 1999. Sequence of the non-structural protein gene encoded by RNA1 of striped jack nervous necrosis virus. J Gen Virol. 80(11):3019–3022.
Nguyen HD, Nakai T, Muroga K. 1996. Progression of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) infection in naturally and experimentally infected striped jack *Pseudocaranx dentex* larvae. Dis Aquat Org. 24(2):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. Appl Environ Microbiol. 63(4):1633–1636.
Olveira JG, Souto S, Dopazo CP, Bandín I. 2013. Isolation of betanodavirus from farmed turbot *Psetta maxima* showing no signs of viral encephalopathy and retinopathy. Aquaculture. 406–407:125–130.
Olveira JG, Souto S, Dopazo CP, Thiéry R, Barja JL, Bandín I. 2009. Comparative analysis of both genomic segments of betanodaviruses isolated from epizootic outbreaks in farmed fish species provides evidence for genetic reassortment. J Gen Virol. 90(Pt 12):2940–2951.
Overstreet RM, Stuck KC, Krol RA, Hawkins WE. 1988. Experimental infections with Baculovirus penaei in the White Shrimp *Penaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda) as a bioassay. J World Aquac Soc. 19(4):175–187.
Reed LJ, Muench H. 1938. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. Am J Hyg. 27(3):493–497.
Silva SMBC, Lavander HD, de Santana Luna MM, de Melo Eloi da Silva AO, Gálvez AO, Coimbra MRM. 2015. *Artemia franciscana* as a vector for infectious myonecrosis virus (IMNV) to *Litopenaeus vannamei* juvenile. J

Invertebr Pathol. 126:1–5. http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2015.02.001.

Skliris GP, Richards RH. 1998. Assessment of the susceptibility of the brine shrimp *Artemia salina* and rotifer *Brachionus plicatilis* to experimental nodavirus infections. Aquaculture. 169(1–2):133–141.

Souto S, Olveira JG, Alonso MC, Dopazo CP, Bandín I. 2018. Betanodavirus infection in bath-challenged *Solea senegalensis* juveniles: a comparative analysis of RGNNV, SJNNV and reassortant strains. J Fish Dis. 41(10): 1571–1578.

Sudhakaran R, Yoganandhan K, Ishaq Ahmed VP, Sahul Hameed AS. 2006. Artemia as a possible vector for Macrobrachium rosenbergii nodavirus (MrNV) and extra small virus transmission (XSV) to *Macrobrachium rosenbergii* post-larvae. Dis Aquat Org. 70(1–2):161–166.

Toffan A, Pascoli F, Pretto T, Panzarin V, Abbadi M, Buratin A, Quartesan R, Gijón D, Padrós F. 2017. Viral nervous necrosis in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) caused by reassortant betanodavirus RGNNV/SJNNV: an emerging threat for Mediterranean aquaculture. Sci Rep. 7: 46755.

Toffolo V, Negrisolo E, Maltese C, Bovo G, Belvedere P, Colombo L, Dalla Valle L. 2007. Phylogeny of betanodaviruses and molecular evolution of their RNA polymerase and coat proteins. Mol Phylogenet Evol. 43(1): 298–308.

Turgay E, Steinum TM, Eryalçın KM, Yardımcı RE, Karataş S. 2020. The influence of diet on the microbiota of live-feed rotifers (*Brachionus plicatilis*) used in commercial fish larviculture. FEMS Microbiol Lett. 367(2):fnaa020.

Valverde EJ, Labella AM, Borrego JJ, Castro D. 2019. *Artemia* spp., a susceptible host and vector for lymphocystis disease virus. Viruses. 11(6):506.

Volpe E, Grodzki M, Panzarin V, Guercio A, Purpari G, Serratore P, Ciulli S. 2018. Detection and molecular characterization of betanodaviruses retrieved from bivalve molluscs. J Fish Dis. 41(4):603–611.

Volpe E, Gustinelli A, Caffara M, Errani F, Quaglio F, Fioravanti ML, Ciulli S. 2020. Viral nervous necrosis outbreaks caused by the RGNNV/SJNNV reassortant betanodavirus in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Aquaculture. 523(February):735155.

Volpe E, Pagnini N, Serratore P, Ciulli S. 2017. Fate of red-spotted grouper nervous necrosis virus (RGNNV) in experimentally challenged Manila clam *Ruditapes philippinarum*. Dis Aquat Org. 125(1):53–61.

Wildt M, Harzsch S. 2002. A new look at an old visual system: structure and development of the compound eyes and optic ganglia of the brine shrimp *Artemia salina* Linnaeus, 1758 (Branchiopoda, Anostraca). J Neurobiol. 52(2):117–132.

Yan DC, Dong SL, Huang J, Zhang JS. 2007. White spot syndrome virus (WSSV) transmission from rotifer inoculum to crayfish. J Invertebr Pathol. 94(2):144–148.

Zhang JS, Dong SL, Tian XL, Dong YW, Liu XY, Yan DC. 2006. Studies on the rotifer (*Brachionus urceus* Linnaeus, 1758) as a vector in white spot syndrome virus (WSSV) transmission. Aquaculture. 261(4):1181–1185.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

RightsLink

Home | Help | Email Support | Sign in | Create Account



Interspecies transmission between Solea senegalensis and Sparus aurata of reassortant Nervous Necrosis Virus (NNV) strains and effect of stress on the outcome of the infection

Author: L. Vázquez-Salgado,J.G. Olveira,C.P. Dopazo,I. Bandín

Publication: Aquaculture

Publisher: Elsevier

Date: 30 January 2022

© 2021 The Authors. Published by Elsevier B.V.

Journal Author Rights

Please note that, as the author of this Elsevier article, you retain the right to include it in a thesis or dissertation, provided it is not published commercially. Permission is not required, but please ensure that you reference the journal as the original source. For more information on this and on your other retained rights, please visit: https://www.elsevier.com/about/our-business/policies/copyright#Author-rights

BACK CLOSE WINDOW

© 2022 Copyright - All Rights Reserved | Copyright Clearance Center, Inc. | Privacy statement | Data Security and Privacy | For California Residents | Terms and ConditionsComments? We would like to hear from you. E-mail us at customercare@copyright.com

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Aquaculture 547 (2022) 737519

Contents lists available at ScienceDirect

Aquaculture

journal homepage: www.elsevier.com/locate/aquaculture

Interspecies transmission between *Solea senegalensis* and *Sparus aurata* of reassortant Nervous Necrosis Virus (NNV) strains and effect of stress on the outcome of the infection

L. Vázquez-Salgado, J.G. Olveira, C.P. Dopazo, I. Bandín *

Instituto de Acuicultura, Departamento de Microbiología y Parasitología – Universidade de Santiago de Compostela, 15706 Santiago de Compostela, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:
RGNNV/SJNNV
Senegalese sole
Gilthead seabream
Interspecies transmission
Stress
hsp70 gene

ABSTRACT

Viral Encephalopathy and Retinopathy (VER) episodes in Southern Europe have led to the isolation of several reassortant NNV strains from different fish species, including Senegalese sole and gilthead seabream. Polyculture of both species is being developed to optimize available resources. However, this farming technique can be threatened by NNV horizontal transmission between diseased fish or asymptomatic carriers and non-infected individuals from both fish species, which could lead to a VER outbreak in the facility and seriously affect fish production. Therefore, in this study we have assessed the susceptibility of gilthead seabream and Senegalese sole to two reassortant NNV strains isolated from each of the two fish species, and the possibility of interspecies transmission by cohabiting infected and naïve individuals. Our results showed that both NNV isolates caused moderate mortality rates and replicated in both fish species. In the cohabitation challenges, infective NNV particles were recovered from naïve cohabitants, demonstrating interspecies transmission from infected individuals that shed NNV into the water column. In addition, cumulative mortality in sole cohabitants was significantly higher, presumably due to the stress provoked by the aggressiveness of gilthead seabream. This is supported by the analysis of the *hsp70* gene, a stress biomarker overexpressed in the sole cohabitants, especially in those that died on the first day of cohabitation. Therefore, despite the numerous advantages of polyculture, the risk of VER outbreaks represents a serious constraint for the implementation of this technique in Mediterranean aquaculture.

1. Introduction

The Nervous Necrosis Virus (NNV) -G. *Betanodavirus*- is the causative agent of Viral Encephalopathy and Retinopathy (VER), a neurological pathology affecting a great number of fish larvae and juveniles worldwide. This non-enveloped virus contains two molecules of positive-sense ssRNA, RNA 1 and RNA2, encoding the viral polymerase and the capsid protein, respectively (Mori et al., 1992). Based on a partial sequence of RNA2, namely the T4 region, the NNV is clustered into 4 genotypes: BFNNV (Barfin Flounder Nervous Necrosis Virus), RGNNV (Red-spotted Grouper Nervous Necrosis Virus), SJNNV (Striped Jack Nervous Necrosis Virus) and TPNNV (Tiger Puffer Nervous Necrosis Virus) (Nishizawa et al., 1997). Moreover, reassortant strains RGNNV/SJNNV and SJNNV/RGNNV have been isolated from sea bass (*Dicentrarchus labrax*), Mediterranean mackerel (*Trachurus mediterraneus*), sole (*Solea solea* and *S. senegalensis*) and gilthead seabream (*S. aurata*), both farmed and in the wild in Southern Europe (Bitchava et al., 2019; Olveira et al., 2009; Panzarin et al., 2012; Toffan et al., 2017; Toffolo et al., 2007; Volpe et al., 2020).

VER-infected fish shed NNV into the water environment probably through the skin and gills (Souto et al., 2018). This water-borne virus enters the new hosts, targeting the central nervous system and retina, where it causes the histological damage responsible for the alteration of swimming patterns and loss of appetite (Bandín and Souto, 2020).

Abbreviations: NNV, nervous necrosis virus; SJNNV, striped jack nervous necrosis virus; RGNNV, redspotted grouper nervous necrosis virus; TPNNV, tiger puffer nervous necrosis virus; BFNNV, barfin flounder nervous necrosis virus; VER, viral encephalopathy and retinopathy; CPE, cytopathic effect; M.O.I, multiplicity of infection; bp, base pair; HSP, heat shock protein; PP, posterior probability; pi, post-infection; dpi, days post-infection; dpc, days post-cohabitation; pc, post-cohabitation.

* Corresponding author.
E-mail address: isabel.bandin@usc.es (I. Bandín).

https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737519
Received 2 February 2021; Received in revised form 1 September 2021; Accepted 23 September 2021
Available online 27 September 2021
0044-8486/© 2021 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Horizontal transmission commonly occurs among diseased and healthy fish belonging to the same species (Hick et al., 2011; Péducasse et al., 1999; Souto et al., 2015c), but has also been observed between different species. Interspecies transmission has been reported between European sea bass and gilthead seabream both on farms and under experimental conditions (Castric et al., 2001; Volpe et al., 2020), Asian sea bass (*Lates calcarifer*) and brown-marbled grouper (*Epinephelus fuscoguttatus*) (Manin and Ransangan, 2011) and Atlantic cod (*Gadus morhua*) and turbot (*Scophthalmus maximus*) (Korsnes et al., 2012).

The increasing worldwide demand for fish has led to the development of new aquaculture strategies, such as polyculture, to optimize and maximize available resources. This technique, which consists of rearing different invertebrate and/or fish species by cohabiting the same area, provides both economic benefits and improved product quality. However, it can also constitute a serious threat to production due to pathogens spreading through susceptible individuals (FAO, 2020) and because of the stress induced by rearing species with different behavioural patterns, since coping with stress deteriorates fish health and worsens the outcome of a possible infection (Kristiansen et al., 2020). Under stress conditions, teleost fish activate the hypothalamus – pituitary gland – interrenal gland (HPI) axis (Tort et al., 2019) that leads to the release of cortisol into the bloodstream and enhances the synthesis of heat shock proteins (HSP), a warning signal for the immune system (Mazeaud et al., 1977; Pockley, 2003; Sopinka et al., 2016). Overexpression of hsp70 gene has been reported in NNV-infected European seabass (*D. labrax*) and Asian seabass (*L. calcarifer*) (Lama et al., 2020; Liu et al., 2016).

Gilthead seabream and Senegalese sole are two finfish species cultivated using this approach (Ferreira et al., 2010), with the highest production rate in Mediterranean aquaculture (FAO, 2020). Therefore, the aim of this work was to assess the susceptibility of gilthead seabream and Senegalese sole to two different reassortant (RGNNV/SJNNV) NNV strains isolated from each fish species and to investigate the possibility of interspecies transmission between cohabiting infected and naïve individuals as well as to analyse the effects of cohabitation stress on the outcome of the infection.

2. Methods

2.1. Viral isolates and propagation

Two NNV isolates were used in this study: SpSs_IAusc160.03 (hereafter 160.03) isolated from diseased Senegalese sole (Olveira et al., 2009) and SpSa_IAusc382.17 (hereafter 382.17) isolated from gilthead seabream juveniles. These strains were propagated at a MOI of 0.1 in semiconfluent E-11 cell monolayers (Iwamoto et al., 2000) grown on Leibovitz's L-15 medium (Gibco, Fisher Scientific, Scotland, UK) supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS; Corning, NY, USA). Infected cell cultures were maintained at 25 °C with L-15 supplemented with 2% FBS until cytopathic effect (CPE) was extensive and then crude viruses were clarified by centrifugation at 3000 x g for 15 min at 4 °C. The supernatants were titrated in 96-well plates for 10 days at 25 °C, expressing the titre as the 50% tissue culture infection dose per ml ($TCID_{50}$ ml^{-1}) (Reed and Muench, 1938).

2.2. Genetic characterisation and phylogenetic analysis of SpSa382.17

Both genomic segments of the 382.17 isolate were sequenced with the primers described by Olveira et al. (2009), and the nucleotide sequence was submitted to GenBank with accession numbers MT707973 for RNA1 and MT707974 for RNA2. Partial sequences (994 bp in RNA1 and 632 bp in RNA2) edited using DNASTAR Lasergene® v.7.1 (DNASTAR, Madison, USA) were subjected to phylogenetic analysis.

The fitting model was estimated with JModelTest (Darriba et al., 2012), comparing the edited sequence of both RNA molecules with those of the four genotypes (4 RGNNV, 2 SJNNV, 4 BFNNV and 1 TPNNV) and 17 reassortant (RGNNV/SJNNV) strains deposited in GenBank (Table 1). The phylogenetic relationship was established by Bayesian inference employing the HYK + G model using BEAST 1.10.4. Four Markov chains were run for 1000,000 generations and, to obtain a consensus tree, the first 10,000 trees were discarded and then sampled every 1000. The robustness of the phylogenetic representation was indicated by the Bayesian Posterior Probability (PP), considering significative values higher than 70%. Trees were rooted using the sequence of Nodamura Virus [NoV; GenBank accession no. NC_002690 (RNA1), NC_0026911 (RNA2)] and Black Bettle Virus [BBV; NC_001411 (RNA1), NC_002037 (RNA2)] as an outgroup.

To determine the pairwise identity of the coding sequence, the 382.17 isolate was subjected to multiple alignment using MegAlign (DNASTAR) with the sequences listed in Table 1. In addition, the amino acid identity percentage was calculated with regard to the Italian and Iberian reassortant isolates using Geneious (Geneious v. 4.5.6, Biomatters, http://www.geneious.com/).

2.3. Fish infection challenges

Senegalese sole and gilthead seabream juveniles (mean weight 1 g) were infected by bath and cohabitation challenges according to the European Guidelines (Directive 2010/63/UE) for the protection of animals used for scientific purposes. The infection protocol was approved by the Galician Committee for experimental animal welfare and by the Xunta de Galicia (Permit Id. 15,010/2020/004). A total of 846 individuals (423 of each fish species) fed ad libitum with commercial fish feed were kept in opaque 50-l tanks containing sea water (salinity 33 g l^{-1}) and acclimated for 14 days at 25 °C (L12:D12) at the fish facilities of University of Santiago de Compostela. Prior to the challenges, 3 fish of each species were killed with an MS-222 anaesthetic overdose (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) and tested for the presence of viral and bacterial pathogens. Viral detection was accomplished by RT-PCR using specific primers for infectious pancreatic necrosis virus (IPNV), viral haemorrhagic necrosis virus (VHSV) and NNV as previously described (Olveira et al., 2013). For bacteriological analysis, internal organs were inoculated in tryptone soy agar supplemented with 1% NaCl (TSA-1).

Infection trials were performed as following:

- Bath infection: a total of 210 Senegalese sole and 210 gilthead seabream were bath exposed to a viral concentration of 10^5 $TCID_{50}$ ml^{-1} for 5 h with strong aeration with either the 160.03 or 382.17 strains. Triplicate groups (35 fish/tank) were established for each experimental infection. Challenges were terminated after 35 days of infection.
- Cohabitation challenges (Fig. 1): a total of 360 fish (180/fish species) were used. For each cohabitation experiment 90 Senegalese sole and 90 gilthead seabream were bath infected for 5 h with the 160.03 and 382.17 strain, respectively, at 10^5 $TCID_{50}$ ml^{-1}. Fish belonging to each species were distributed into 3 tanks (30 fish/tank). At 48 h post infection, 30 naïve sole or gilthead seabream were introduced in each of the tanks to cohabit with infected gilthead seabream and Senegalese sole, respectively. Challenges were terminated after 33 days of cohabitation.

In addition, in order to reduce the number of fish used in this study, one control group per species ($N = 15$) challenged with L-15 medium and one cohabitation control (15 fish of each species) were set up and handled like the infected groups, following the conditions described in the bath infection. Clinical signs and mortalities were recorded daily. Dead fish were removed from the tanks and stored at −20 °C until virological analysis. Surviving fish at the end of the experiment were euthanized using an MS-222 overdose.

Table 1
Reference strains used for the phylogenetic analysis and the genetic characterisation.

Virus isolate (genotype)	Year	Species	Country	Reference	GenBank accession no.	
					RNA1	RNA2
SaIAUSC61_05 (RGNNV/SJNNV)	2005	Gilthead seabream	Portugal	(Olveira et al., 2009)	FJ803912	FJ803918
SaIAUSC74_05 (RGNNV/SJNNV)	2005	Gilthead seabream	Portugal	(Olveira et al., 2009)	FJ803913	FJ803919
SsIAUSC573_04 (RGNNV/SJNNV)	2004	Senegalese sole	Portugal	(Olveira et al., 2009)	FJ803914	FJ803920
SaIAUSC156_03 (RGNNV/SJNNV)	2003	Gilthead seabream	Spain	(Olveira et al., 2009)	FJ803916	FJ803921
SsIAUSC160_03 (RGNNV/SJNNV)	2003	Senegalese sole	Spain	(Olveira et al., 2009)	FJ803911	FJ803923
SsIAUSC1974_08 (RGNNV/SJNNV)	2008	Senegalese sole	Spain	(Olveira et al., 2009)	FJ803917	FJ803922
SpSaIAUSC382_17 (RGNNV/SJNNV)	2017	Gilthead seabream	Spain	This report	MT707973	MT707974
G9508KS (RGNNV)	2002	Redspotted grouper	Japan	(Lee et al. 2002)	AY690597	AY690596
SpPmIAUSC1586_10 (RGNNV)	2010	Turbot	Spain	(Olveira et al., 2013)	KC696563	KC696562
SGWak97 (RGNNV)	1997	Redspotted grouper	Japan	(Iwamoto et al., 2004)	NC_008040	NC_008041
DlIAUSC1688_08 (RGNNV)	2008	Sea bass	Spain	(Olveira et al., 2013)	FJ803915	FJ829452
SJNNV (SJNNV)	1993	Striped jack	Japan	(Nagai & Nishizawa 1999)	AB025018	–
SJ_G91 (SJNNV)	1993	Striped	Japan	(Nishizawa et al. 1995)	–	D30814
SJ93Nag (SJNNV)	1993	Striped jack	Japan	(Iwamoto et al. 2001)	AB056571	AB056572
BF93Hok (BFNNV)	1993	Barfin flounder	Japan	(Nishizawa et al. 1995)	EU826137	EU826138
AH99NorA (BFNNV)	1995	Atlantic halibut	Norway	(Grotmol et al. 2000; Sommerset & Nerland 2004)	AJ401165	AJ245641
Ac06NorT (BFNNV)	2007	Atlantic cod	Norway	Patel and others (Unpublished data)*	EF617330	EF617329
GmMR11_06 (BFNNV)	2008	Atlantic cod	Norway	(Nylund et al. 2008)	EF433472	EF433468
TPKag93 (TPNNV)	1993	Tiger puffer	Japan	(Nishizawa et al. 1995; Toffolo et al., 2007)	AM085332	D38637
430.2004 (RGNNV/SJNNV)	2004	Senegalese sole	Italy	(Panzarin et al., 2012)	JN189911	JN189932
477.2004 (RGNNV/SJNNV)	2004	Senegalese sole	Italy	(Panzarin et al., 2012)	JN189913	JN189938
17.1C.2004 (RGNNV/SJNNV)	2004	Sea bass	Italy	(Panzarin et al., 2012)	JN189900	JN189934
367.2.2005 (RGNNV/SJNNV)	2005	Sea bass	Italy	(Panzarin et al., 2012)	JN189909	JN189936
82.4.2007 (RGNNV/SJNNV)	2007	Gilthead seabream	Italy	(Vendramin et al., 2014)	JX290516	JX290518
169-4/Mar2009 (RGNNV/SJNNV)	2009	Gilthead seabream	Italy	(Toffan et al., 2017)	KY354683	KY354695
203-3/May2010 (RGNNV/SJNNV)	2010	Gilthead seabream	Italy	(Toffan et al., 2017)	KY354685	KY354697
461-1/Nov2014 (RGNNV/SJNNV)	2014	Gilthead seabream	Italy	(Toffan et al., 2017)	KY354688	KY354702
127-1/Mar2015 (RGNNV/SJNNV)	2015	Gilthead seabream	Italy	(Toffan et al., 2017)	KY354692	KY354704
575/Nov2015 (RGNNV/SJNNV)	2015	Gilthead seabream	Italy	(Toffan et al., 2017)	KY354691	KY354705
165-6/Mar2016 (RGNNV/SJNNV)	2016	Gilthead seabream	Italy	(Toffan et al., 2017)	KY354693	KY354706

* Unpublished data; direct submission to GenBank

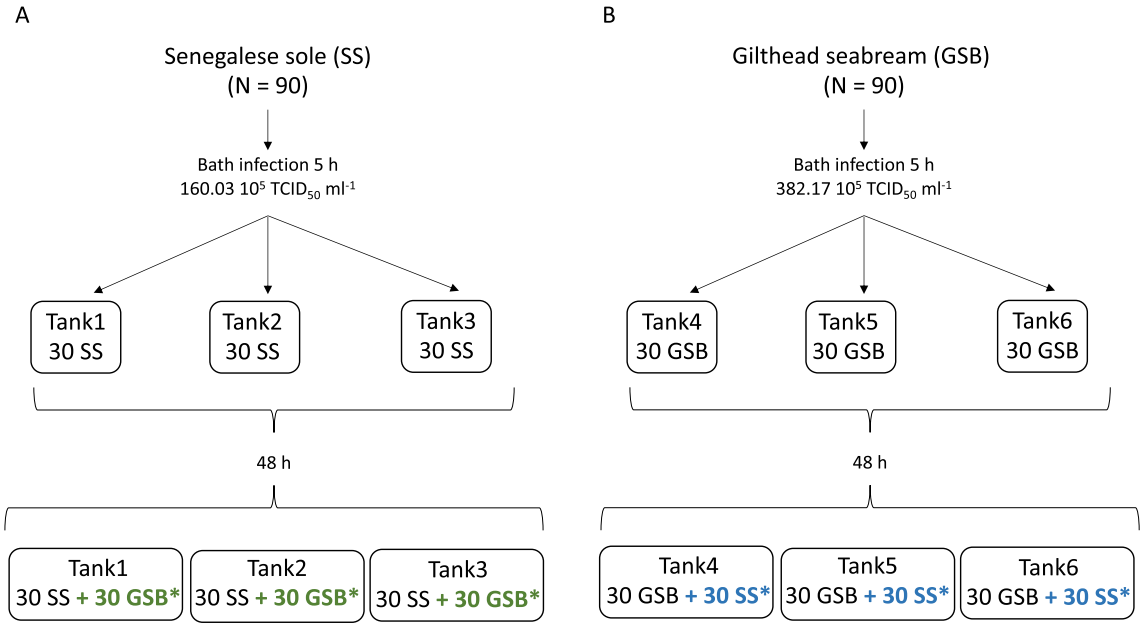


Fig. 1. Schematic representation of the cohabitation challenges. **A)** Cohabitation 1: 160.03-infected Senegalese sole (SS) + naïve gilthead seabream (GSB) co-habitants and **B)** cohabitation 2: 382.17-infected GSB + naïve SS. Naïve cohabitants are represented by an asterisk (*).

2.4. Virological analysis and NNV quantification

Individual head samples (including eye and brain tissue) were homogenized (1:10 w v^{-1}) in Earle's balanced salt solution (Hyclone Laboratories Inc., Logan, Utah, USA) supplemented with antibiotics (amphotericin B 200 μg ml^{-1}, gentamycin 500 μg ml^{-1}, penicillin 1000 units ml^{-1} and streptomycin 1000 units ml^{-1}). After centrifugation at 4000 x g for 20 min at 4 °C, the resulting supernatants were split into two aliquots; one was stored at −80 °C for later use in RT-qPCR and the other incubated for 24 h at 4 °C, and then inoculated in duplicate onto E-11 cells in 48-well plates (dilutions 10^{-1} and 10^{-2}). The plates were incubated at 25 °C and monitored for CPE development for 10 days. A subcultivation was then performed by inoculating 100 μl of the scrapped cell suspension onto new cultures for a further 10 days. Samples from

survivor fish (S) and control tanks were also analysed.

For NNV quantification, RNA was extracted using NucleoSpin ® RNA (Macherey-Nagel, Duren, Germany) following the manufacturer's instructions. Next, reverse transcription was performed with a RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermoscientific Inc., Vilnius, Lithuania) in a thermocycler MyCycler™ (Bio-Rad, Hercules, California, USA) by incubating the viral RNA with random primers for 5 min at 95 °C and with the reverse transcription mixture for 1 h at 42 °C. Finally, the enzyme was inactivated at 70 °C for 10 min. The resulting cDNA was amplified by qPCR in a CFX-96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) by mixing 2 μl of viral cDNA, with 10 μl of iQ ™ SYBR ® Green Supermix (Bio-Rad) and 200 nM of SnodR1 F/R primers (Olveira et al., 2013). Briefly, after a denaturation/activation step at 95 °C for 3 min, cDNA was subjected to 40 denaturation (15 s at 95 °C) and annealing-extension (20 s at 59 °C) cycles. Total viral RNA content was estimated using a standard curve generated from 20-fold serial dilutions of a DNA plasmid containing SpSsIAusc160.03 RNA1 in the range of 10^1 to 10^7 RNA copies ml^{-1}.

2.5. Transcription of the hsp70 gene

Relative transcription of the heat stock protein (*hsp*) 70 gene was quantified in fish subjected to cohabitation assays because HSP70 is considered a biomarker/indicator of several types of stress in fish (Sopinka et al., 2016). In addition, two dead Senegalese sole and two sacrificed seabream individuals from the cohabitation control were also analysed. To this end, the cDNA obtained in the previous section was subjected to qPCR using 200 nM of specific *hsp*70 primers for both Senegalese sole (Salas-Leiton et al., 2010) and gilthead seabream (Bildik et al., 2019), following the same protocol as described above, except for the annealing-extension step, performed at 70 °C for 30 s and at 55 °C for 20 s, for sole and seabream primers, respectively. The expression of the *hsp70* gene was normalised following the 2-ΔΔCt method (Livak and Schmittgen, 2001) using ribosomal 18S RNA as the endogenous reference gene (F: 5'-GTCTGGTTAATTCCGATAA-3'; R: 5'-ACCTGTTATTGCTCAATC-3'; López-Vázquez et al., 2016).

2.6. Statistical analysis

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 8.1 (San Diego, California, USA). Cumulative mortality was analysed using survival curves and the Kaplan-Meyer test, and significant differences among groups were evaluated with the Log-Rank (Mantel-Cox) test. Significance of the viral load and gene expression was assessed using Two-way ANOVA and Tukey correction. $P < 0.05$ was considered statistically significative.

3. Results

3.1. Genetic characterisation and phylogenetic analysis

The phylogenetic representation of the gilthead seabream isolate 382.17 revealed that the RNA1 molecule clustered with the RGNNV strains (Fig. 2A), whereas the RNA2 molecule was grouped within the SJNNV genotype (Fig. 2B), indicating that it is an RGNNV/SJNNV reassortant. As both trees show, 382.17 diverged from the same speciation event (PP = 0.9) like other Italian seabream reassortants (203-3/May2010, 127-1/Mar2015, 575/Nov/2015 or 165-6/Mar2016) and other RGNNV/SJNNV isolates obtained from sea bass and Senegalese sole in the Iberian Peninsula and Italy. Agreeing with the phylogenetic analysis, the nucleotide sequence of the RNA1 segment showed a 96.4% identity with the SGWak97 strain (RGNNV), and RNA2 98.4% with regard to the SJNag93 strain (SJNNV). The homology with the Italian and the Iberian reassortants was 98.1–99.5 and 99.1–99.2%, respectively, in RNA1, and 98.3–99.6% and 97.8–99.4% in RNA2.

As for the amino acid sequence, the 382.17 isolate shows 6 substitutions in the capsid protein with respect to the SJNag93 strain, three of them located on the N-terminal side of the protein ($aa13_{Pro \rightarrow Ala}$, $aa20_{Ser \rightarrow Pro}$, $aa27_{Thr \rightarrow Ile}$) and the remaining 3 on the C-terminal ($aa247_{Ala \rightarrow Ser}$, $aa270_{Asn \rightarrow Ser}$, $aa298_{Phe \rightarrow Tyr}$). Whereas the changes in positions 13 and 20 are shared by the Iberian isolates and the 247 and 270 substitutions were observed in both the Iberian and Italian reassortants, positions 27 and 298 seem to be exclusive to 382.17, although there is no data available for the Italian seabream isolates.

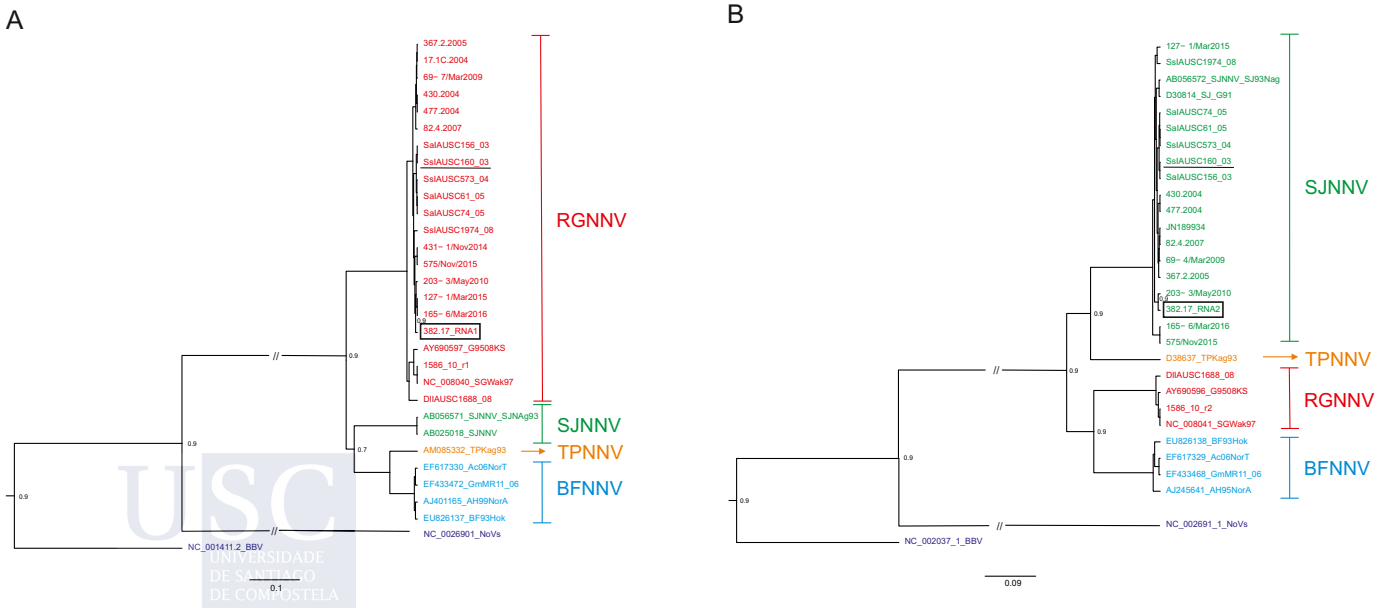


Fig. 2. A) Phylogenetic relationships of 160.03 (underlined) and 382.17 (framed in a box) isolates based on RNA 1 and **B)** RNA2. Numbers indicate Bayesian PPs obtained from the majority rule consensus of trees sampled every 1000 generations after discarding the first 10,000. Bars, (**A**) 0.1 and (**B**) 0.09 nucleotide substitutions per site.

3.2. Gilthead seabream and Senegalese sole susceptibility challenges

Moderate mortality was observed in both species regardless of the source of the viral strain used. Fish infected with strain 160.03 (isolated from *S. senegalensis*) showed the highest mortality levels at 35 dpi (55 and 52% in gilthead seabream and sole, respectively) (Fig. 3A), whereas the challenge with strain 382.17 (isolated from *S. aurata*) caused slightly lower mortality (approximately 47% in gilthead seabream and 40% in Senegalese sole) (Fig. 3B). Furthermore, cumulative mortality recorded in NNV-challenged groups was significantly higher ($p = 0.01$) than in the control groups (CG). First mortalities occurred in gilthead seabream at 8 days post infection (dpi) whereas in Senegalese sole they were not observed until 14 and 15 dpi (fish challenged with 382.17 and 160.03, respectively). In both fish species, mortalities were recorded up to 35 dpi when challenge was terminated because of the worsening of the water conditions. Regarding signs of disease, abnormal swimming behaviour, namely looping and resting belly up, was observed in the infected sole from 7 dpi. However, the gilthead seabream succumbed to death with no obvious VER signs.

Head samples of individual dead fish were grouped ($N = 9$) according to the mortality phase (T1 - initial mortality, T2 – acute mortality and T3 – late mortality). As shown in Fig. 3C and Fig. 3D, both NNV strains replicated to a higher extent in Senegalese sole than in gilthead seabream (a significantly higher number of viral RNA copies, p value <0.05). Infected sole showed an initial average viral load around 10^9 NNV RNA copies per fish gram (7.76×10^8 and 1.48×10^9, in fish infected with 160.03 and 382.17, respectively) that decreased to 3.4×10^7 at T3 (3.55×10^7 and 3.24×10^7, in 160.03 and 382.17 infected sole, respectively). On the other hand, infected gilthead seabream contained a similar NNV load in all the phases analysed, with an average of 2.1×10^5 RNA copies g^{-1} regardless of the strain (T1 average values: 5.25×10^5 and 3.24×10^4; T2: 1.26×10^5 and 3.02×10^5; T3: 1.32×10^5 and 6.76×10^4 RNA copies g^{-1} in fish infected with 160.03 and 382.17, respectively). In both fish species, survivors carried a similar number of NNV copies to dead fish (p value >0.05). NNV infective particles were recovered in cell culture from all samples obtained in all 4 challenges. No virus was detected in the control fish.

3.3. Interspecies transmission challenges

3.3.1. Cohabitation 1: infected Senegalese sole and naïve gilthead seabream

Senegalese sole infected with strain 160.03 exhibited an altered behaviour after naïve gilthead seabream were added to the tanks. Calmly resting on the bottom of the tanks (normal behaviour for flat fish) turned into agitated and quick swimming, trying to escape from the seabream that became aggressive and attacked the resting sole, although no external wounds were observed. The onset of mortality in sole occurred just 1 day post cohabitation (dpc), 3 dpi, reaching 50% at 10 dpc (12 dpi) and no fish survived the challenge beyond 21 dpc (23 dpi). Erratic swimming behaviour was observed from day 6 pc, 8 dpi, onwards. No disease signs were observed throughout the experiment in cohabitant gilthead seabream and the first deaths (2%) were observed on day 6 pc. At 28 dpc, 50% of the individuals had died and at the end of the challenge (33 dpc), mortality reached 78% (Fig. 4A). These data indicated that the cohabitation challenge led to an earlier onset of mortality than the immersion challenges in both species, and to a significantly higher cumulative mortality ($p < 0.01$) with regard to the susceptibility challenges and the cohabitation control (CC). Most of the

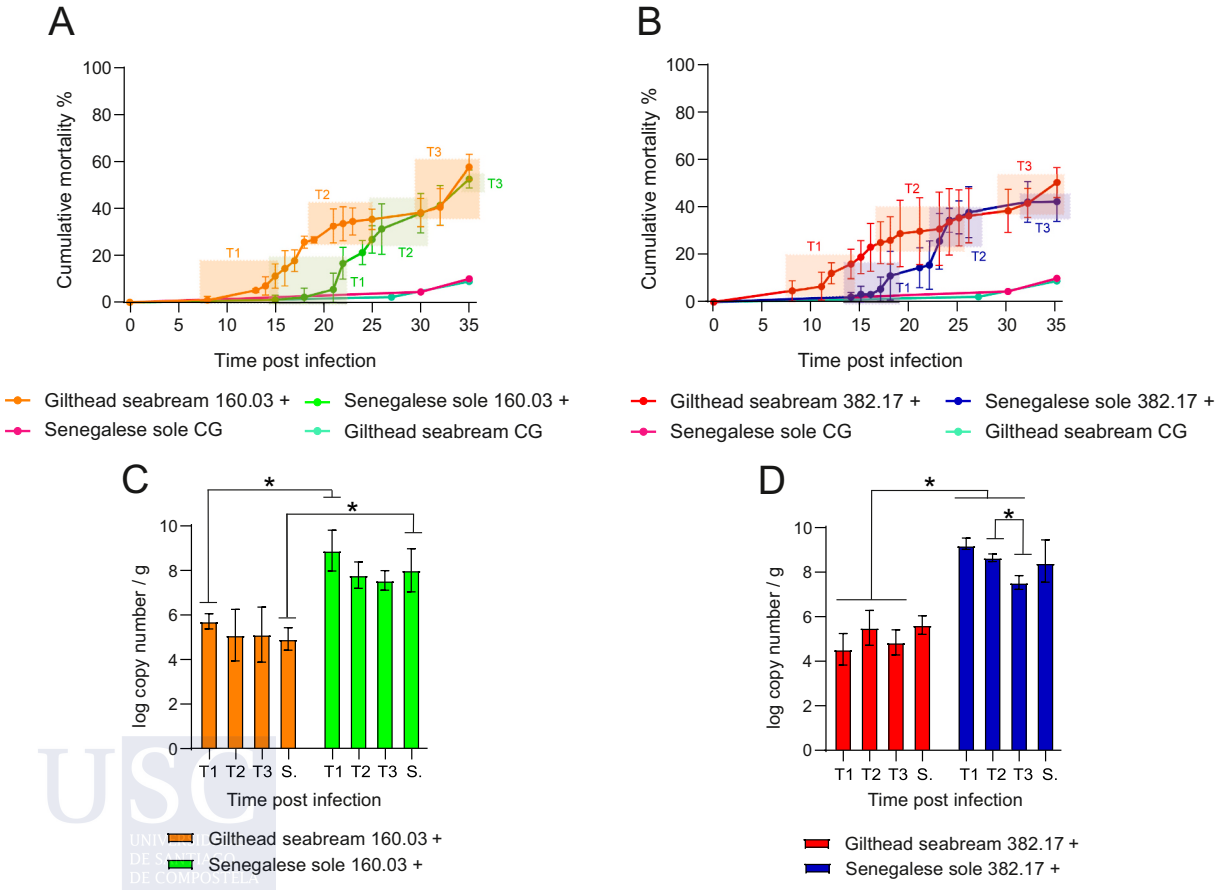


Fig. 3. Susceptibility challenges of gilthead seabream and Senegalese sole. Cumulative mortality in fish challenged with **A)** 160.03 and **B)** 382.17 strains. CG, control group mock infected with L-15. Number of NNV copies (log10 RNA) per fish gram detected in fish challenged with **C)** 160.03 and **D)** 382.17 strains at initial (T1), acute (T2) and final (T3) mortality stages. S, survivors. Each bar represents the mean ± SD ($N = 9$). Asterisks * represent significative differences (p value <0.05).

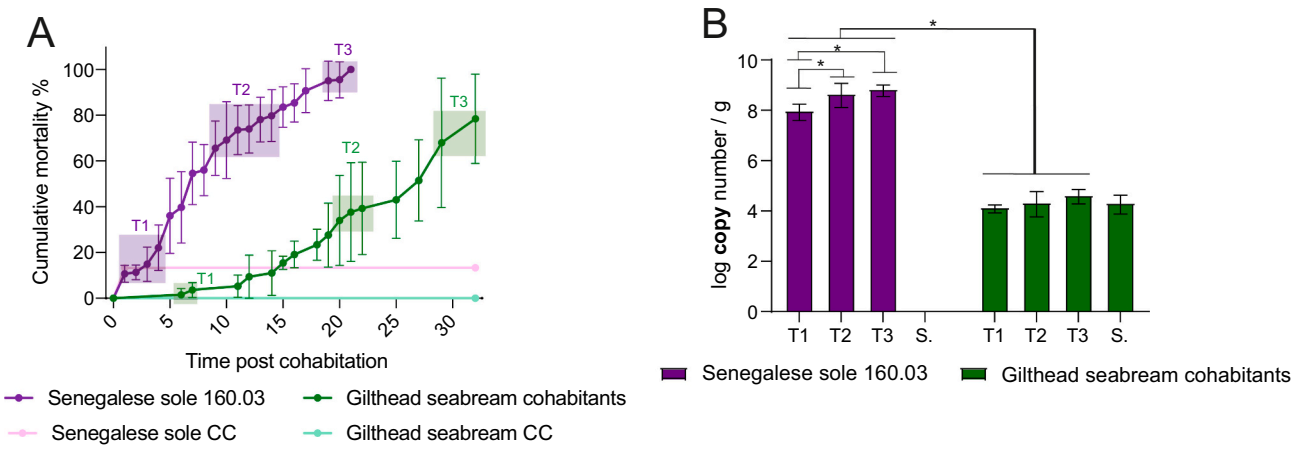


Fig. 4. Interspecies transmission challenge, cohabitation 1. **A)** Cumulative mortality in 160.03-infected Senegalese sole and naïve gilthead seabream cohabitants, and fish from cohabitation controls (CC). **B)** Viral load detected in head samples of 160.03-infected Senegalese sole and naïve gilthead seabream cohabitants at the three time points analysed as well as in seabream survivors (S). Each bar represents the mean ± SD (N = 9). Asterisks * indicate significative differences (p value <0.05).

dead individuals showed partially empty skull and ocular cavities because tissues were eaten by surviving seabream. Regarding the viral load, at the initial phase (T1), the number of RNA copies in infected sole was 9.77×10^7 and increased significantly in the following phases to 4.57×10^8 at T2 and 7.08×10^8 at T3 (p value <0.05). Significant differences of around 3 logs were observed with regard to gilthead seabream cohabitants (Fig. 4B), which yielded average values of 8.18×10^4.

NNV was recovered in cell culture from all challenged fish, confirming that the 160.03 strain was transmitted from infected Senegalese sole to naïve gilthead seabream. No virus was isolated from the control group.

3.3.2. *Cohabitation 2: infected gilthead seabream and naïve sole*

Infected gilthead seabream attacked and chased naïve Senegalese sole immediately after their introduction as cohabitants, which brought about an agitated and quick swimming pattern in the latter. Although seabream did not show typical VER signs, mortality was first recorded at 4 dpc (6 dpi); on day 18 pc (20 dpi) cumulative mortality yielded 50% and reached 80% at the end of the experiment (Fig. 5A). As occurred in the previous cohabitation experiment, Senegalese sole started to die at 1 dpc and erratic swimming and looping was observed from day 6 pc. Cumulative mortality increased to 50% on day 16 pc and reached similar values to seabream (82%) at the end of the challenge. A comparison with the immersion challenges indicated that the mortality onset was earlier and final cumulative values were significantly higher in both species than in the susceptibility challenges and in the cohabitation control ($p < 0.01$). As in the previous cohabitation experiment, although cohabitants did not show injuries, the smooth tissues of dead fish were partially absent.

The quantification of the viral load (Fig. 5B) showed differences between both species. Thus, whereas gilthead seabream individuals provided similar RNA values throughout the experiment (around 10^5 RNA copies), cohabitant sole showed significantly (p value 0.03) lower initial RNA values (1.45×10^4 at phase T1) but increased progressively to 8.32×10^4 and 4.25×10^5 (T2 and T3, respectively). In the survivors, the number of NNV copies was comparable to that of dead fish in the acute phase of mortality (4.47×10^5). Infective viral particles were recovered in cell culture from both infected and cohabitant fish samples, supporting the interspecies transmission from seabream to sole, but not from the control group.

The gilthead seabream's aggressive behaviour towards the Senegalese sole was observed also in the cohabitation control group. In addition, a 13.3% mortality was recorded in the cohabitant sole on day 1 pc, although no further deaths occurred in either species, and neither were any wounds observed.

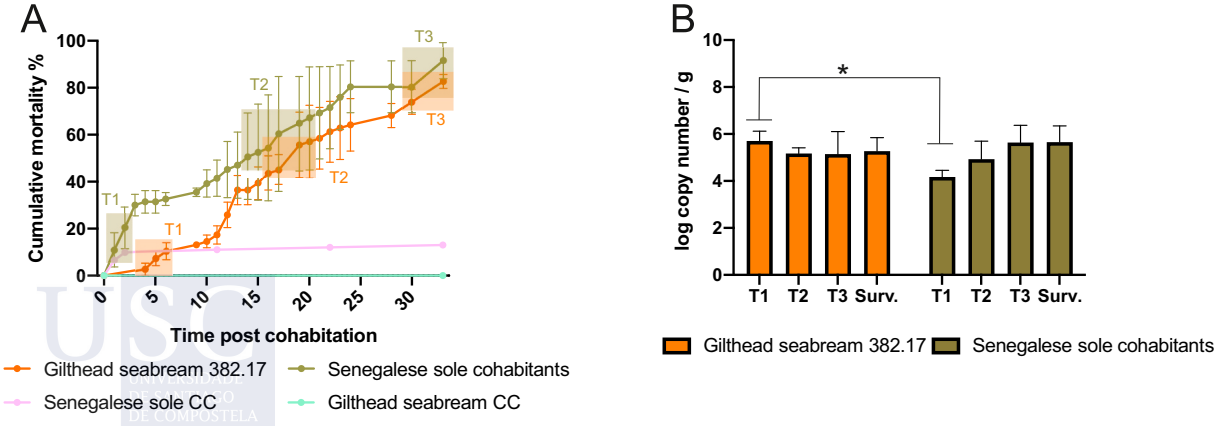


Fig. 5. Interspecies transmission challenge, cohabitation 2. **A)** Cumulative mortality in 382.17-infected gilthead seabream and naïve sole cohabitants, and fish from the cohabitation control (CC). **B)** Viral load detected in head samples of 382.17-infected gilthead seabream and naïve sole cohabitants, at the three time points analysed as well as in survivors (S). Each bar represents the mean ± SD (N = 9). Asterisk * show significative differences (p value <0.05).

3.4. Transcription of the hsp70 gene

As indicated above, in the cohabitation experiments, Senegalese sole no longer rested on the bottom of the tank and tried to escape from the attacks of the gilthead seabream. Therefore, transcription of the *hsp70* gene, a well-known stress biomarker, was quantified in cohabitant fish. In the cohabitation experiment of infected sole with naïve seabream, a significant induction of the relative expression of *hsp70* was observed in the sole that died at 1 dpc (fold change values of 26.44), while this value decreased to around 1–1.5-fold change in the sole individuals that succumbed to death later (Fig. 6A). In the case of the Senegalese sole introduced as cohabitants with the infected seabream, *hsp70* was also overexpressed, although to a lower extent (fold change value at the beginning of mortalities was 7.40), but as mortality progressed, transcription values were maintained slightly higher than in the other cohabitation experiment (5-fold change for T2, and 2-fold change for T3 and survivors) (Fig. 6B). Sole individuals from the cohabitation control ($N = 2$, mortalities recorded at 1 dpc) also showed an increased *hsp*70 expression (average fold change value 6.43) with respect to the non-cohabiting fish (Fig. 6C). Regarding the gilthead seabream, the *hsp70* transcription remained at similar levels throughout both challenges (fold change values between 1 and 2) and non-significant differences were observed with respect to the cohabitation control (Fig. 6A and Fig. 6B).

4. Discussion

In the early 2000s a number of reassortant RGNNV/SJNNV strains were obtained from VER episodes affecting farmed Senegalese sole and gilthead seabream in the Iberian Peninsula (Olveira et al., 2009). More recently, different mass mortality episodes affecting gilthead seabream in the Mediterranean area were also reported to have been caused by RGNNV/SJNNV strains (Toffan et al., 2017; Volpe et al., 2020). Later outbreaks in the Iberian Peninsula led to the isolation of additional strains and among them 382.17 has been phylogenetically characterized and demonstrated to also be an RGNNV/SJNNV reassortant. Although sequencing of the capsid protein showed high homology with reassortant strains isolated so far, two substitutions were detected, one in the N-terminal region, position 27 (Thr ➔ Ile), and the other substitution, aa298 (Phe ➔ Tyr), in the C-terminal region, which is involved in host cell recognition (Ito et al., 2008; Iwamoto et al., 2004) and in virulence for fish (Moreno et al., 2019; Souto et al., 2015a) Therefore, the aim of this study was to evaluate the potential for interspecies transmission of strains isolated from each of the two species and to assess the consequences of cohabitation stress on the outcome of the infection.

First, the susceptibility to the NNV isolates of juvenile fish (mean weight 1 g) from both species was studied. Fish were challenged by immersion, given that waterborne infection provides a more accurate approach of NNV spreading in nature (Kim et al., 2018). Although VER outbreaks in farmed gilthead seabream can occur at temperatures below 20 °C (Toffan et al., 2017) and that the sole-derived isolate (160.03) causes higher mortality rates in Senegalese sole at 22 °C (Souto et al., 2015c), these experimental infections were conducted at 25 °C because it is a temperature commonly reached in the Mediterranean and in the South European Atlantic coastal waters during the summer, when most VER episodes are reported. Although both NNV strains caused moderate-high mortalities in both fish species, the 160.03 isolate was responsible for the highest. However, mortality in sole at 25 °C was not as high as at 22 °C, as already reported (Souto et al., 2019). The results obtained for gilthead seabream can only be compared to a natural outbreak affecting juveniles (Volpe et al., 2020). Although the mortality observed in that report was higher than that observed in our challenge, the fact that the fish were survivors from a previous outbreak and the higher temperature (28 °C) could account for these differences. Besides, none of the challenged seabream showed signs of infection, which is in agreement with previous findings in larvae and juveniles during disease outbreaks (Toffan et al., 2017; Volpe et al., 2020) and under experimental conditions (Toffan et al., 2021), whereas erratic swimming was exhibited in infected sole from the first days pi. Infective NNV particles were recovered in cell culture from all infected individuals, demonstrating that both NNV isolates can cause infection and replicate in gilthead seabream and sole. Therefore, our results support the threat that the RGNNV/SJNNV reassortant may represent to gilthead and sole farming as previously reported (Souto et al., 2015b; Toffan et al., 2017; Volpe et al., 2020).

The ability of the sole-derived strain to infect other species such as turbot and sea bass has already been demonstrated in experimental infections, although mortality caused in these species was significantly lower than that observed in sole (Souto et al., 2015b, 2016). Moreover, we have previously shown that the seabream-derived strain can be transmitted to sole larvae through infected *Artemia* nauplii causing high mortalities (Vázquez-Salgado et al., 2020). On the other hand, experimental infections of sea bass with different seabream reassortant RGNNV/SJNNV strains have been reported, although low mortalities were recorded (Vendramin et al., 2014). Nevertheless, cross transmission of a reassortant strain from infected to naïve fish had not yet been demonstrated. Our results indicate not only that naïve sole and seabream cohabitants were infected with either of the two NNV isolates but also that cohabitation caused earlier and higher mortality than the bath challenges.

The onset of mortality in sole at just 1 dpc (in both infected and naïve cohabitants) and their behavioural changes in response to the continuous attacks from gilthead seabream, a dominant pattern already described (Kudoh and Yamaoka, 2004), prompted us to measure stress

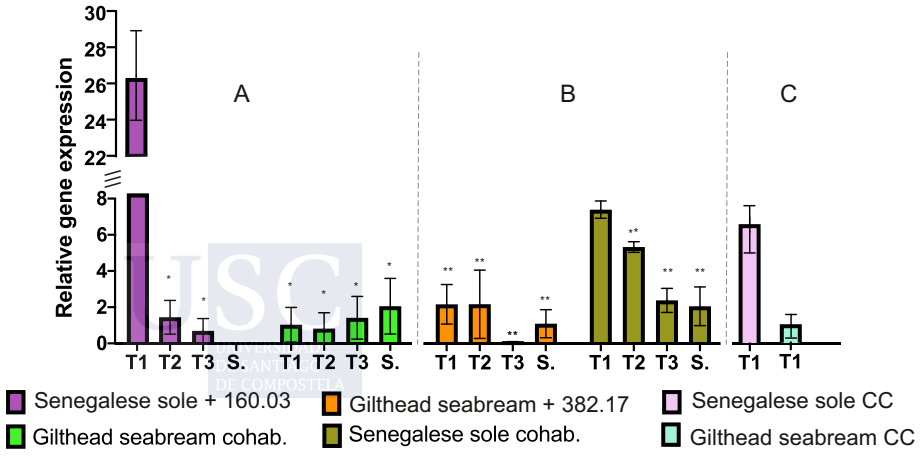


Fig. 6. Relative *hsp*70 expression in head samples of dead individuals from cohabitation challenges at 3 mortality stages. **A**) 160.03-infected Senegalese sole (T1: 1 dpc, T2: 9 dpc, T3: 21 dpc) and gilthead seabream cohabitants (T1: 6 dpc, T2: 20 dpc, T3: 29 dpc). **B)** 382.17-infected seabream (T1: 4 dpc, T2: 19 dpc, T3: 30 dpc) and sole cohabitants (T1: 1 dpc, T2: 14 dpc, T3: 30 dpc). **C)** Fish from the cohabitation control (CC) (T1: 1 dpc). Each bar represents the mean ± SD (N = 9). Significative differences (p value <0.05) with respect to the T1 of 160- infected Senegalese sole* and cohabitant Senegalese sole**.

levels in the fish. Therefore, the relative expression of the *hsp70* gene, a well-known stress biomarker (Pockley, 2003; Tort et al., 2019), was quantified in the fish subjected to cohabitation experiments. Gene transcription in the naïve sole individuals cohabiting with infected seabream was enhanced at 1 dpc (7.40-fold change) which seems to indicate that cohabitation is a stress factor. This hypothesis is supported by the similar *hsp70* transcription values observed in the sole from the cohabitation control group and by previous reports showing an increase in *hsp70* expression in the optic and vagal lobes of goldfish (*Carassius auratus*) after cohabiting with bluegills (*Lepomis macrochirus*), a potential predator (Kagawa et al., 1999). The overexpression of *hsp*70 was significantly higher in the cohabitant infected sole which died 1 dpc (26.44-fold change), suggesting that NNV infection could also be involved in the induction of this gene, as observed in other NNV-infected fish (Lama et al., 2020; Liu et al., 2016). This overexpression could be caused by the activation of the gene promotor, as demonstrated in *Ctenopharyngodon idellus* kidney (CIK) cells infected with the Grass Carp Reovirus (GCRV) (Yu et al., 2020). Although an apparently stressed behaviour was observed in the sole throughout the cohabitation experiment, the dead fish analysed in the acute and late mortality phases showed significantly lower *hsp70* transcription levels. This finding suggests that after a severe increase, the stress response in sole in terms of gene expression can be modulated, as reported in rainbow trout or tilapia (Basu et al., 2001; Iwama et al., 2004).

On the other hand, it is interesting that the viral load in naïve sole cohabitants was significantly lower than that observed in the infected individuals (from both the bath and cohabitation challenges), possibly due to the low viral load in the water, as it depends on the shedding from infected gilthead seabream. This finding, together with the aforementioned increase in *hsp70* gene expression, suggests that both stress and viral infection could be involved in the early mortalities observed in the naïve cohabitant sole and could have contributed to the increased mortality observed in the cohabitation experiments. The effect of stress on the correct functioning of the immune system and its consequences on the severity of fish infections has already been reported (Tort, 2011).

Regarding gilthead seabream, NNV horizontal transmission from infected sole could have occurred not only through the water column, as observed in striped jack or Senegalese sole (Nguyen et al., 1997; Souto et al., 2018), but also because of the ingestion of NNV infected nervous tissue from dead fish. Gilthead seabream display a cannibalistic behaviour (Castric et al., 2001) especially observed with soft tissues of dead fish. Cannibalism was more evident in the case of dead congeners, which showed the skull and eye cavity to be almost empty, whereas in sole the brain was partially eaten, probably because of their head morphology. The low viral quantification achieved in this study could be due to an underestimation of the viral load. However, considering that NNV replication in gilthead seabream larvae was demonstrated to be around 2 logs above to that detected in our study (Toffan et al., 2021), it could be due to the low replication efficiency displayed by NNV reassortants in seabream individuals beyond the larval stage, as suggested by these authors. Alternatively, it could be explained by the neutralization of the NNV particles by the strong immune response in the early stages of viral infection as observed in the brain of adult seabream individuals (Chaves-Pozo et al., 2012).

On the other hand, the *hsp70* expression levels in this fish species were not significantly enhanced after the cohabitation with the Senegalese sole, indicating that, as a species with an intrinsic nervous and aggressive behaviour, the cohabitation with sole did not increase their stress levels. Therefore, other factors rather than stress must be involved in the increase in mortality observed in both cohabitation challenges.

To conclude, this study has demonstrated that reassortant NNV strains isolated from gilthead seabream and Senegalese sole can infect both fish species causing similar levels of mortality. In addition, NNV horizontal transmission between both fish species was recorded, highlighting the threat that interspecies transmission can represent for Mediterranean aquaculture. It is also worth mentioning the serious impact of stress on the outcome of the infection in Senegalese sole, which led to a significant increase in mortality. Therefore, rearing NNV susceptible species in cohabitation, showing dominant and submissive behaviour, constitutes a serious risk of VER outbreaks that could lead to large production and economic losses.

Author statement

IB, LVS, conceived and designed the experiments, LVS, JGOH performed the experiments; IB, LVS, JGOH, CPD analysed the data; LVS and IB wrote the paper; CPD revised the paper. All authors declared to read and accepted the manuscript.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

This research was funded by the Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (MCIUI), the Agencia Estatal de Investigación (AEI) and FEDER under Grant RTI2018-094687-B-C21 and also by the Interreg VA Spain-Portugal cooperation program (POCTEP) 2014-2020, 0474_BLUEBIOLAB project, co-funded by FEDER with a research contract granted to L. Vázquez- Salgado. The authors are grateful to Stolt Sea Farm S.A. and Piscimar SA for kindly providing the fish, A. A. Silva, C. López-Vazquez and J. Franqueira for their contribution to this work, and Native English School of Languages for the English revision.

References

Bandín, I., Souto, S., 2020. Betanodavirus and VER disease: a 30-year research review. Pathogens 9. https://doi.org/10.3390/pathogens9020106.

Basu, N., Nakano, T., Grau, E.G., Iwama, G.K., 2001. The effects of cortisol on heat shock protein 70 levels in two fish species. Gen. Comp. Endocrinol. 124, 97–105. https://doi.org/10.1006/gcen.2001.7688.

Bildik, A., Asıcı Ekren, G., Akdeniz, G., Kıral, F., 2019. Effect of environmental temperature on heat shock proteins (HSP30, HSP70, HSP90) and IGF-I mRNA expression in *Sparus aurata*. *Iran. J. Fish. Sci.* 18, 1014–1024. https://doi.org/10.22092/ijfs.2018.116979.

Bitchava, K., Chassalevris, T., Lampou, E., Athanassopoulou, F., Economou, V., Dovas, C. I., 2019. Occurrence and molecular characterization of betanodaviruses in fish and invertebrates of the Greek territorial waters. J. Fish Dis. 00, 1–11. https://doi.org/10.1111/jfd.13098.

Castric, J., Thiéry, R., Jeffroy, J., de Kinkelin, P., Raymond, J.C., 2001. Sea bream *Sparus aurata*, an asymptomatic contagious fish host for nodavirus. Dis. Aquat. Org. 47, 33–38. https://doi.org/10.1002/jat.2712/abstract.

Chaves-Pozo, E., Guardiola, F.A., Meseguer, J., Esteban, M.A., Cuesta, A., 2012. Nodavirus infection induces a great innate cell-mediated cytotoxic activity in resistant, gilthead seabream, and susceptible, European sea bass, teleost fish. Fish Shellfish Immunol. 33, 1159–1166.

Darriba, D., Taboada, G.L., Doallo, R., Posada, D., 2012. JModelTest 2: More models, new heuristics and parallel computing. Nat. Methods 9, 772. https://doi.org/10.1038/nmeth.2109.

FAO, 2020. The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Sustainability in action. FAO, Rome. https://doi.org/10.4060/ca9229en.

Ferreira, H., Ramalho, A., Dias, J., Yúfera, M., Arias, A., Falcão, M., Conceição, L., 2010. Sustainable semi-intensive polyculture of seabream and sole in earthen ponds. Aquac. Eur. 35, 17–21.

Hick, P., Schipp, G., Bosmans, J., Humphrey, J., Whittington, R., 2011. Recurrent outbreaks of viral nervous necrosis in intensively cultured barramundi (*Lates calcarifer*) due to horizontal transmission of betanodavirus and recommendations for disease control. Aquaculture 319, 41–52. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.06.036.

Ito, Y., Okinaka, Y., Mori, K.I., Sugaya, T., Nishioka, T., Oka, M., Nakai, T., 2008. Variable region of betanodavirus RNA2 is sufficient to determine host specificity. Dis. Aquat. Org. 79, 199–205. https://doi.org/10.3354/dao01906.

Iwama, G.K., Afonso, L.O.B., Todgham, A., Ackerman, P., Nakano, K., 2004. Are hsps suitable for indicating stressed states in fish? J. Exp. Biol. 207, 15–19. https://doi.org/10.1242/jeb.00707.

Iwamoto, T., Nakai, T., Mori, K., Arimoto, M., Furusawa, I., 2000. Cloning of the fish cell line SSN-1 for piscine nodaviruses. Dis. Aquat. Org. 43, 81–89. https://doi.org/10.3354/dao043081.

Iwamoto, T., Okinaka, Y., Mise, K., Mori, K.-I., Arimoto, M., Okuno, T., Nakai, T., 2004. Identification of host-specificity determinants in betanodaviruses by using reassortants between striped jack nervous necrosis virus and sevenband grouper nervous necrosis virus. J. Virol. 78, 1256–1262. https://doi.org/10.1128/jvi.78.3.1256-1262.2004.

Kagawa, N., Ryo, K., Mugiya, Y., 1999. Enhanced expression of stress protein 70 in the brains of goldfish, *Carassius auratus*, reared with bluegills, *Lepomis macrochirus*. Fish Physiol. Biochem. 21, 103–110. https://doi.org/10.1023/A:1007785707501.

Kim, Jae Ok, Kim, S.J., Kim, Jong Oh., Kim, W.S., Oh, M.J., 2018. Distribution of nervous necrosis virus (NNV) in infected sevenband grouper, *Hyporthodus septemfasciatus* by intramuscular injection or immersion challenge. Aquaculture 489, 1–8. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.01.042.

Korsnes, K., Karlsbakk, E., Nylund, A., Nerland, A.H., 2012. Horizontal transmission of nervous necrosis virus between turbot *Scophthalmus maximus* and Atlantic cod *Gadus morhua* using cohabitation challenge. Dis. Aquat. Org. 99, 13–21. https://doi.org/10.3354/dao02454.

Kristiansen, T.S., Fernö, A., Pavlidis, M.A., van de Vis, H. (Eds.), 2020. The Welfare of Fish. Springer Nature. https://doi.org/10.3354/dao075155.

Kudoh, T., Yamaoka, K., 2004. Territorial behavior in juvenile red sea bream *Pagrus major* and crimson sea bream *Evynnis japonica*. Fish. Sci. 70, 241–246. https://doi.org/10.1111/j.1444-2906.2003.00797.x.

Lama, R., Pereiro, P., Valenzuela-Muñoz, V., Gallardo-Escárate, C., Tort, L., Figueras, A., Novoa, B., 2020. RNA-Seq analysis of European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) infected with nodavirus reveals powerful modulation of the stress response. Vet. Res. 51, 1–22. https://doi.org/10.1186/s13567-020-00784-y.

Liu, P., Wang, L., Kwang, J., Yue, G.H., Wong, S.M., 2016. Transcriptome analysis of genes responding to NNV infection in Asian seabass epithelial cells. Fish Shellfish Immunol. 54, 342–352. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.04.029.

Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-ΔΔCT method. Methods 25, 402–408. https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262.

López-Vázquez, C., Alonso, M.C., Dopazo, C.P., Bandín, I., 2016. In vivo study of viral haemorrhagic septicaemia virus and infectious pancreatic necrosis virus coexistence in Senegalese sole (*Solea senegalensis*). J. Fish Dis. 40, 1129–1139. https://doi.org/10.1111/jfd.12585.

Manin, B.O., Ransangan, J., 2011. Experimental evidence of horizontal transmission of Betanodavirus in hatchery-produced Asian seabass, *Lates calcarifer* and brown-marbled grouper, *Epinephelus fuscoguttatus* fingerling. Aquaculture 321, 157–165. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.08.021.

Mazeaud, M.M., Mazeaud, F., Donaldson, E.M., 1977. Primary and secondary effects of stress in fish: some new data with a general review. Trans. Am. Fish. Soc. 106, 201–212. https://doi.org/10.1577/1548-8659(1977)106<201:paseos>2.0.co;2.

Moreno, P., Souto, S., Leiva-Rebollo, R., Borrego, J.J., Bandín, I., Alonso, M.C., 2019. Capsid amino acids at positions 247 and 270 are involved in the virulence of betanodaviruses to European sea bass. Sci. Rep. 9, 1–11. https://doi.org/10.1038/s41598-019-50622-1.

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, 368–371. https://doi.org/10.1016/0042-6822(92)90329-N.

Nguyen, H.D., Mushiake, K., Nakai, T., Muroga, K., 1997. Tissue distribution of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) in adult striped jack. Dis. Aquat. Org. 28, 87–91. https://doi.org/10.3354/dao028087.

Nishizawa, T., Furuhashi, M., Nagai, T., Nakai, T., Muroga, K., 1997. Genomic classification of fish nodaviruses by molecular phylogenetic analysis of the coat protein gene. Appl. Environ. Microbiol. 63, 1633–1636.

Olveira, J.G., Souto, S., Dopazo, C.P., Thiéry, R., Barja, J.L., Bandín, I., 2009. Comparative analysis of both genomic segments of betanodaviruses isolated from epizootic outbreaks in farmed fish species provides evidence for genetic reassortment. J. Gen. Virol. 90, 2940–2951. https://doi.org/10.1099/vir.0.013912-0.

Olveira, J.G., Souto, S., Dopazo, C.P., Bandín, I., 2013. Isolation of betanodavirus from farmed turbot *Psetta maxima* showing no signs of viral encephalopathy and retinopathy. Aquaculture 406–407, 125–130. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.05.007.

Panzarin, V., Fusaro, A., Monne, I., Cappellozza, E., Patarnello, P., Bovo, G., Cattoli, G., 2012. Molecular epidemiology and evolutionary dynamics of betanodavirus in southern Europe. Infect. Genet. Evol. 12, 63–70. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.10.007.

Péducasse, S., Castric, J., Thiéry, 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. Dis. Aquat. Org. 36, 11–20. https://doi.org/10.3354/dao036011.

Pockley, G., 2003. Heat shock proteins as chaperones of the immune response. Lancet 362, 469–476.

Reed, L.J., Muench, H., 1938. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. Am. J. Hyg. 27, 493–497.

Salas-Leiton, E., Anguis, V., Martín-Antonio, B., Crespo, D., Planas, J.V., Infante, C., Manchado, M., 2010. Effects of stocking density and feed ration on growth and gene expression in the Senegalese sole (*Solea senegalensis*): Potential effects on the immune response. Fish Shellfish Immunol. 28, 296–302. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2009.11.006.

Sopinka, N.M., Donaldson, M.R., O'Connor, C.M., Suski, C.D., Cooke, S.J., 2016. Stress Indicators in Fish, Fish Physiology. Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802728-8.00011-4

Souto, S., Biacchesi, S., Olveira, J.G., Mérour, E., Brémont, M., Bandín, I., 2015a. In vitro and in vivo characterization of molecular determinants of virulence in reassortant betanodavirus. J. Gen. Virol. 96, 1287–1296. https://doi.org/10.1099/vir.0.000064.

Souto, S., Lopez-Jimena, B., Alonso, M.C., García-Rosado, E., Bandín, I., 2015b. Experimental susceptibility of European sea bass and Senegalese sole to different betanodavirus isolates. Vet. Microbiol. 177, 53–61. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.02.030.

Souto, S., Olveira, J.G., Bandín, I., 2015c. Influence of temperature on Betanodavirus infection in Senegalese sole (*Solea senegalensis*). Vet. Microbiol. 179, 162–167. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.07.004.

Souto, S., Olveira, J.G., Dopazo, C.P., Bandín, I., 2016. Reassortant betanodavirus infection in turbot (*Scophthalmus maximus*). J. Fish Dis. 39, 1347–1356. https://doi.org/10.1111/jfd.12466.

Souto, S., Olveira, J.G., Alonso, M.C., Dopazo, C.P., Bandín, I., 2018. Betanodavirus infection in bath-challenged Solea senegalensis juveniles: A comparative analysis of RGNNV, SJNNV and reassortant strains. *J. Fish Dis*. 00, 1–8. https://doi.org/10.1111/jfd.12865.

Souto, S., Vázquez-Salgado, L., Olveira, J.G., Bandín, I., 2019. Amino acidic substitutions in the polymerase N-terminal region of a reassortant betanodavirus strain causing poor adaptation to temperature increase. Vet. Res. 50, 50. https://doi.org/10.1186/s13567-019-0669-4.

Toffan, A., Pascoli, F., Pretto, T., Panzarin, V., Abbadi, M., Buratin, A., Padrós, F., 2017. Viral nervous necrosis in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) caused by reassortant betanodavirus RGNNV/SJNNV: an emerging threat for Mediterranean aquaculture. Sci. Rep. 7, 46755. https://doi.org/10.1038/srep46755.

Toffan, A., Biasini, L., Preto, T., Abbadi, M., Buratin, A., Franch, R., Pascoli, F., 2021. Age dependency of RGNNV/SJNNV viral encephalo-retinopathy in Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata*). Aquaculture. 539, 736605. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736605.

Toffolo, V., Negrisolo, E., Maltese, C., Bovo, G., Belvedere, P., Colombo, L., Dalla Valle, L., 2007. Phylogeny of betanodaviruses and molecular evolution of their RNA polymerase and coat proteins. Mol. Phylogenet. Evol. 43, 298–308. https://doi.org/10.1016/j.ympev.2006.08.003.

Tort, L., 2011. Stress and immune modulation in fish. Dev. Comp. Immunol. 35, 1366–1375. https://doi.org/10.1016/j.dci.2011.07.002.

Comparative endocrine stress responses in vertebrates. In: Tort, L., Narayan, E.J., Cockrem, J.F. (Eds.), 2019. Frontiers in Endocrinology. Frontiers Media SA, Lausanne. https://doi.org/10.3389/978-2-88963-317-3.

Vázquez-Salgado, L., Olveira, J.G., Dopazo, C.P., Bandín, I., 2020. Role of rotifer (*Brachionus plicatilis*) and *Artemia* (*Artemia salina*) nauplii in the horizontal transmission of a natural nervous necrosis virus (NNV) reassortant strain to Senegalese sole (*Solea senegalensis*) larvae. Vet. Q. 40, 205–214. https://doi.org/10.1080/01652176.2020.1810357.

Vendramin, N., Toffan, A., Mancin, M., Cappellozza, E., Panzarin, V., Bovo, G., Terregino, C., 2014. Comparative pathogenicity study of ten different betanodavirus strains in experimentally infected European sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.). *J*. Fish Dis. 37, 371–383. https://doi.org/10.1111/jfd.12117.

Volpe, E., Gustinelli, A., Caffara, M., Errani, F., Quaglio, F., Fioravanti, M.L., Ciulli, S., 2020. Viral nervous necrosis outbreaks caused by the RGNNV/SJNNV reassortant betanodavirus in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Aquaculture 523, 735155. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735155.

Yu, F., Wang, L., Li, W., Wang, H., Que, S., Lu, L., 2020. Aquareovirus NS31 protein serves as a specific inducer for host heat shock 70-kDa protein. J. Gen. Virol. 101, 145–155. https://doi.org/10.1099/jgv.0.001363.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

JOHN WILEY AND SONS LICENSE
TERMS AND CONDITIONS

Jul 01, 2022

This Agreement between Mrs. Lucía Vázquez ("You") and John Wiley and Sons ("John Wiley and Sons") consists of your license details and the terms and conditions provided by John Wiley and Sons and Copyright Clearance Center.

License Number	5340111072513
License date	Jul 01, 2022
Licensed Content Publisher	John Wiley and Sons
Licensed Content Publication	Journal of Fish Diseases
Licensed Content Title	Effect of rearing density on nervous necrosis virus infection in Senegalese sole (Solea senegalensis)
Licensed Content Author	Isabel Bandín, Carlos P. Dopazo, Jose G. Olveira, et al
Licensed Content Date	Aug 30, 2021
Licensed Content Volume	44
Licensed Content Issue	12
Licensed Content Pages	11
Type of use	Dissertation/Thesis
Requestor type	Author of this Wiley article

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Format	Print and electronic
Portion	Full article
Will you be translating?	Yes, including English rights
Number of languages	1
Title	Epidemiología y Patogenicidad de betanodavirus
Institution name	Universidade de Santiago de Compostela
Expected presentation date	Oct 2022
Specific Languages	Spanish
Requestor Location	Mrs. Lucía Vázquez Rúa Constantino Candeira, s/n Santiago de Compostela, 15705 Spain Attn: Salgado
Publisher Tax ID	EU826007151
Total	0.00 EUR

Terms and Conditions

TERMS AND CONDITIONS

This copyrighted material is owned by or exclusively licensed to John Wiley & Sons, Inc. or one of its group companies (each a"Wiley Company") or handled on behalf of a society with which a Wiley Company has exclusive publishing rights in relation to a particular work (collectively "WILEY"). By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the billing and payment terms and conditions established by the Copyright Clearance Center Inc., ("CCC's Billing and Payment terms and conditions"), at the time that you opened your RightsLink account (these are available at any time at http://myaccount.copyright.com).

Terms and Conditions

- The materials you have requested permission to reproduce or reuse (the "Wiley Materials") are protected by copyright.

- You are hereby granted a personal, non-exclusive, non-sub licensable (on a stand-alone basis), non-transferable, worldwide, limited license to reproduce the Wiley Materials for the purpose specified in the licensing process. This license, **and any CONTENT (PDF or image file) purchased as part of your order,** is for a one-time use only and limited to any maximum distribution number specified in the license. The first instance of republication or reuse granted by this license must be completed within two years of the date of the grant of this license (although copies prepared before the end date may be distributed thereafter). The Wiley Materials shall not be used in any other manner or for any other purpose, beyond what is granted in the license. Permission is granted subject to an appropriate acknowledgement given to the author, title of the material/book/journal and the publisher. You shall also duplicate the copyright notice that appears in the Wiley publication in your use of the Wiley Material. Permission is also granted on the understanding that nowhere in the text is a previously published source acknowledged for all or part of this Wiley Material. Any third party content is expressly excluded from this permission.

- With respect to the Wiley Materials, all rights are reserved. Except as expressly granted by the terms of the license, no part of the Wiley Materials may be copied, modified, adapted (except for minor reformatting required by the new Publication), translated, reproduced, transferred or distributed, in any form or by any means, and no derivative works may be made based on the Wiley Materials without the prior permission of the respective copyright owner.**For STM Signatory Publishers clearing permission under the terms of the STM Permissions Guidelines only, the terms of the license are extended to include subsequent editions and for editions in other languages, provided such editions are for the work as a whole in situ and does not involve the separate exploitation of the permitted figures or extracts,** You may not alter, remove or suppress in any manner any copyright, trademark or other notices displayed by the Wiley Materials. You may not license, rent, sell, loan, lease, pledge, offer as security, transfer or assign the Wiley Materials on a stand-alone basis, or any of the rights granted to you hereunder to any other person.

- The Wiley Materials and all of the intellectual property rights therein shall at all times remain the exclusive property of John Wiley & Sons Inc, the Wiley Companies, or their respective licensors, and your interest therein is only that of having possession of and the right to reproduce the Wiley Materials pursuant to Section 2 herein during the continuance of this Agreement. You agree that you own no right, title or interest in or to the Wiley Materials or any of the intellectual property rights therein. You shall have no rights hereunder other than the license as provided for above in Section 2. No right, license or interest to any trademark, trade name, service mark or other branding ("Marks") of WILEY or its licensors is granted hereunder, and you agree that you shall not assert any such right, license or interest with respect thereto

- NEITHER WILEY NOR ITS LICENSORS MAKES ANY WARRANTY OR REPRESENTATION OF ANY KIND TO YOU OR ANY THIRD PARTY, EXPRESS, IMPLIED OR STATUTORY, WITH RESPECT TO THE MATERIALS OR THE ACCURACY OF ANY INFORMATION CONTAINED IN THE MATERIALS, INCLUDING, WITHOUT LIMITATION, ANY IMPLIED WARRANTY OF MERCHANTABILITY, ACCURACY, SATISFACTORY QUALITY, FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE, USABILITY, INTEGRATION OR NON-INFRINGEMENT AND ALL SUCH WARRANTIES ARE HEREBY EXCLUDED BY WILEY AND ITS LICENSORS AND WAIVED

BY YOU.

- WILEY shall have the right to terminate this Agreement immediately upon breach of this Agreement by you.

- You shall indemnify, defend and hold harmless WILEY, its Licensors and their respective directors, officers, agents and employees, from and against any actual or threatened claims, demands, causes of action or proceedings arising from any breach of this Agreement by you.

- IN NO EVENT SHALL WILEY OR ITS LICENSORS BE LIABLE TO YOU OR ANY OTHER PARTY OR ANY OTHER PERSON OR ENTITY FOR ANY SPECIAL, CONSEQUENTIAL, INCIDENTAL, INDIRECT, EXEMPLARY OR PUNITIVE DAMAGES, HOWEVER CAUSED, ARISING OUT OF OR IN CONNECTION WITH THE DOWNLOADING, PROVISIONING, VIEWING OR USE OF THE MATERIALS REGARDLESS OF THE FORM OF ACTION, WHETHER FOR BREACH OF CONTRACT, BREACH OF WARRANTY, TORT, NEGLIGENCE, INFRINGEMENT OR OTHERWISE (INCLUDING, WITHOUT LIMITATION, DAMAGES BASED ON LOSS OF PROFITS, DATA, FILES, USE, BUSINESS OPPORTUNITY OR CLAIMS OF THIRD PARTIES), AND WHETHER OR NOT THE PARTY HAS BEEN ADVISED OF THE POSSIBILITY OF SUCH DAMAGES. THIS LIMITATION SHALL APPLY NOTWITHSTANDING ANY FAILURE OF ESSENTIAL PURPOSE OF ANY LIMITED REMEDY PROVIDED HEREIN.

- Should any provision of this Agreement be held by a court of competent jurisdiction to be illegal, invalid, or unenforceable, that provision shall be deemed amended to achieve as nearly as possible the same economic effect as the original provision, and the legality, validity and enforceability of the remaining provisions of this Agreement shall not be affected or impaired thereby.

- The failure of either party to enforce any term or condition of this Agreement shall not constitute a waiver of either party's right to enforce each and every term and condition of this Agreement. No breach under this agreement shall be deemed waived or excused by either party unless such waiver or consent is in writing signed by the party granting such waiver or consent. The waiver by or consent of a party to a breach of any provision of this Agreement shall not operate or be construed as a waiver of or consent to any other or subsequent breach by such other party.

- This Agreement may not be assigned (including by operation of law or otherwise) by you without WILEY's prior written consent.

- Any fee required for this permission shall be non-refundable after thirty (30) days from receipt by the CCC.

- These terms and conditions together with CCC's Billing and Payment terms and conditions (which are incorporated herein) form the entire agreement between you and WILEY concerning this licensing transaction and (in the absence of fraud) supersedes all prior agreements and representations of the parties, oral or written. This Agreement may not be amended except in writing signed by both parties. This Agreement shall be binding upon and inure to the benefit of the parties' successors, legal representatives, and authorized assigns.

- In the event of any conflict between your obligations established by these terms and conditions and those established by CCC's Billing and Payment terms and conditions, these terms and conditions shall prevail.

- WILEY expressly reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.

- This Agreement will be void if the Type of Use, Format, Circulation, or Requestor Type was misrepresented during the licensing process.

- This Agreement shall be governed by and construed in accordance with the laws of the State of New York, USA, without regards to such state's conflict of law rules. Any legal action, suit or proceeding arising out of or relating to these Terms and Conditions or the breach thereof shall be instituted in a court of competent jurisdiction in New York County in the State of New York in the United States of America and each party hereby consents and submits to the personal jurisdiction of such court, waives any objection to venue in such court and consents to service of process by registered or certified mail, return receipt requested, at the last known address of such party.

WILEY OPEN ACCESS TERMS AND CONDITIONS

Wiley Publishes Open Access Articles in fully Open Access Journals and in Subscription journals offering Online Open. Although most of the fully Open Access journals publish open access articles under the terms of the Creative Commons Attribution (CC BY) License only, the subscription journals and a few of the Open Access Journals offer a choice of Creative Commons Licenses. The license type is clearly identified on the article.

The Creative Commons Attribution License

The Creative Commons Attribution License (CC-BY) allows users to copy, distribute and transmit an article, adapt the article and make commercial use of the article. The CC-BY license permits commercial and non-

Creative Commons Attribution Non-Commercial License

The Creative Commons Attribution Non-Commercial (CC-BY-NC)License permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.(see below)

Creative Commons Attribution-Non-Commercial-NoDerivs License

The Creative Commons Attribution Non-Commercial-NoDerivs License (CC-BY-NC-ND) permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited, is not used for commercial purposes and no modifications or adaptations are made. (see below)

Use by commercial "for-profit" organizations

Use of Wiley Open Access articles for commercial, promotional, or marketing purposes requires further explicit permission from Wiley and will be subject to a fee.

Further details can be found on Wiley Online Library
http://olabout.wiley.com/WileyCDA/Section/id-410895.html

Other Terms and Conditions:

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Check for updates

Received: 14 July 2021 | Revised: 9 August 2021 | Accepted: 10 August 2021

DOI: 10.1111/jfd.13514

RESEARCH ARTICLE

Journal of Fish Diseases WILEY

Effect of rearing density on nervous necrosis virus infection in Senegalese sole (*Solea senegalensis*)

Lucía Vázquez-Salgado | Jose G. Olveira | Carlos P. Dopazo | Isabel Bandín

Departamento de Microbiología y Parasitología, Instituto de Acuicultura, Universidade de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain

Correspondence
Isabel Bandín, Departamento de Microbiología y Parasitología, Instituto de Acuicultura, Universidade de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela 15706, Spain.
Email: isabel.bandin@usc.es

Funding information
Interreg VA Spain-Portugal cooperation program (POCTEP) 2014-2020, 0474_BLUEBIOLAB project, co-funded by FEDER

Abstract

Intensive fish farming at high densities results in a wide range of adverse consequences on fish welfare, including pathogen spreading, stress and increased mortality rates. In this work, we have assessed whether the survival of Senegalese sole infected with the nervous necrosis virus (NNV), a pathogen responsible for severe disease outbreaks, is affected by rearing density. Based on the different fish ratios per surface area (g cm^{-2}) and water volume (g L^{-1}), our research showed an earlier mortality onset in the tanks containing NNV-infected fish reared at medium density (MD: 0.071 g cm^{-2}/5 g L^{-1}) and high density (HD: 0.142 g cm^{-2}/10 g L^{-1}), as well as higher cumulative mortality values. However, transcription analysis of *hsp*70, *gr*1 and *pepck* genes, well-known stress biomarkers, seems to indicate that none of the challenged fish were under high stress conditions. NNV load was slightly higher both in dead and in sampled fish from MD and HD groups, and especially in the rearing water from these groups, where peaks in mortality seemed to correlate with increasing NNV load in the water. In conclusion, our results suggest that rearing NNV-infected Senegalese sole at high densities resulted in an earlier mortality onset and higher cumulative values and viral load.

KEYWORDS
cumulative mortality, nervous necrosis virus, rearing density, Senegalese sole, viral load

1 | INTRODUCTION

The nervous necrosis virus (NNV), genus *Betanodavirus*, is the aetiological agent of viral encephalopathy and retinopathy (VER), a neurological pathology affecting fish worldwide. NNV is a small non-enveloped virus containing bisegmented ssRNA (+). The largest segment, RNA1, encodes the protein A or RNA-dependent RNA polymerase (RdRp), whereas the RNA2 segment codes the capsid protein (Mori et al., 1992). NNV is clustered into four genotypes, according to a classification based on the T4 region (RNA2): barfin flounder nervous necrosis virus (BFNNV), redspotted grouper nervous necrosis virus (RGNNV), striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) and tiger puffer nervous necrosis virus (TPNNV) (Nishizawa et al., 1997). Furthermore, reassortant strains between RGNNV and SJNNV (RGNNV/SJNNV and SJNNV/RGNNV) have been isolated in southern Europe from several fish species, including sole (*Solea senegalensis* and *S. solea*), European seabass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead seabream (*Sparus aurata*), among others (Olveira et al., 2009; Panzarin et al., 2012; Toffan et al., 2017; Toffolo et al., 2007; Volpe et al., 2020).

Nervous necrosis virus-infected fish show abnormal swimming behaviour, provoked by the cytopathic damage (necrosis and vacuolization) of the nervous tissue, and can transmit the virus to cohabitant fish by shedding infective particles into the water column

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.
© 2021 The Authors. *Journal of Fish Diseases* published by John Wiley & Sons Ltd.

through the skin and gills (Souto et al., 2018). NNV horizontal transmission can severely jeopardize intensive farming strategies developed to maximize production given that density is a factor commonly related to VER outbreaks (Bandín & Souto, 2020). In addition, rearing fish above a density threshold may adversely affect fish performance, including slower growth, reduced food intake and alterations in normal behaviour and immune response (Tort, 2011; Yarahmadi et al., 2016). Therefore, in order to determine whether high rearing densities can favour VER outbreaks in the aquaculture facilities, NNV experimental infections were performed in Senegalese sole stocked at different densities.

2 | METHODOLOGY

2.1 | Production of viral inoculum

The betanodavirus strain used in this study was SpSsIAusc160.03, a reassortant RGNNV/SJNNV isolated from diseased Senegalese sole (*S. senegalensis*; Olveira et al., 2009). Semi-confluent E-11 cell monolayers grown with Leibovitz's 15 medium (L-15; Gibco, Fisher Scientific) and supplemented with 5% foetal bovine serum (FBS) were used to propagate the virus (MOI 0.1). Inoculated cells were maintained at 25°C until cytopathic effect (CPE) was extensive. The viral suspension was clarified by centrifugation at 3000 *g* for 20 min, and 10-fold dilutions of the supernatant were inoculated in 96-well plates for 7–10 days at 25°C. CPE development was monitored daily for 10 days, and viral titre was expressed as the 50% tissue culture infection dose per ml ($TCID_{50}$/ml) (Reed & Muench, 1938).

2.2 | Fish infection challenges

Senegalese sole juveniles (N = 885; mean body weight 1 ± 0.1 g) were acclimated in opaque 300-L tanks containing recirculating sea water (salinity 33 g L^{-1}) at 22°C and fed ad libitum at the facilities of the University of Santiago de Compostela. Fish were strictly handled according to the current regulations on animal welfare (Directive 2010/63/UE) in experimental procedures, and the experimental protocol was approved by the Bioethics and Experimental Animal Welfare Committees of the University of Santiago de Compostela and Xunta de Galicia (Permit Id. 15010/2020/004). Prior to the challenges, five fish were randomly collected and killed using an MS-222 (Sigma-Aldrich) overdose and tested for the presence of bacterial and viral pathogens. Bacterial isolation was accomplished by inoculating samples of kidney, spleen and liver onto tryptone soy agar supplemented with 1% NaCl (TSA-1) and incubated at 25°C for 24 h. For viral analysis, RT-qPCR was performed using specific primer sets for NNV, viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV), infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) and infectious haematopoietic necrosis virus (IHNV) (Olveira et al., 2013).

Fish (N = 660) were bath-infected with the SpSsIAusc160.03 strain (10^5 $TCID_{50}$/ml) for 4 h with strong aeration. Fish were then randomly distributed into 12 flat-bottomed tanks (area: 700 cm^2) to assay, in triplicate, different rearing densities according to tank surface and water volume (Figure 1): high density (HD: 100 fish; 0.142 g cm^{-2}/10 g L^{-1}), medium density (MD: 50 fish; 0.071 g cm^{-2}/5 g L^{-1}), medium/low density (MLD: 50 fish; 0.071 g cm^{-2}/1 g L^{-1}) and low density (LD: 20 fish; 0.028 g cm^{-2}/1 g L^{-1}). One replicate tank was allocated for fish sampling (N = 3) on days 3, 5, 7, 10, 15, 20, 25, 30 and 35 post-infection (pi). In the remaining two replicate tanks, the development of the infection in the fish was monitored (disease signs and mortality) and viral shedding was assessed. For this purpose, an aliquot of 50 ml water was collected at 1 h post-infection (hpi) and 1, 2, 3, 5, 7, 10, 15, 20, 25, 30 and 35 days post-infection (dpi). No additional sea water was added to the experimental tanks. Fish and water samples were stored at −20°C until use. A mock-infected tank per condition was also set up. Control fish were challenged with L-15 medium and handled as infected fish.

2.3 | Virological analysis

Sole tissue samples (brain and eyes) were aseptically collected and individually homogenized (1:10 w/v) in Earle's Balanced Salt Solution (Hyclone Laboratories Inc.), supplemented with amphotericin B (200 μg ml^{-1}), gentamycin (500 μg ml^{-1}), penicillin and streptomycin (1000 units ml^{-1}). Survivors were analysed in pools consisting of three fish. The homogenate was centrifuged at 4000 *g* for 20 min at 4°C, and the supernatants were stored at −20°C until virological analysis. Water samples were twice centrifuged at 96,000 *g* for 1 h in an SW32ti rotor (Beckman Coulter), and pellets were resuspended in 500 μl of saline–sodium citrate (SSC) buffer 1X. Tissue and water samples were titrated as previously described.

For NNV quantification, samples were subjected to RNA extraction using a NucleoSpin ® Kit (Macherey-Nagel) following the instructions provided by the manufacturer. Total RNA was incubated with random primers (200 nM) for 5 min at 95°C and then with the reverse transcription mixture containing RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific Inc.), for 1 h at 42°C in a thermocycler MyCycler™ (Bio-Rad). The reaction was terminated by inactivating the enzyme at 70°C for 10 min. RT-qPCR was performed in a CFX-96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) amplifying the cDNA (2 μl) with 200 nM of SnodR1 F/R primers (5′-TCCAAAAGAAAGAAGCATAC-3′/5′-TGGCATGTACCACGGAAC-3′; Olveira et al., 2013) and iQ ™ SYBR® Green Supermix (10 μl; Bio-Rad). The protocol started with an initial denaturation/activation phase for 3 min at 95°C followed by 40 denaturation and annealing–extension cycles (15 s at 95°C and 20 s at 59°C, respectively). Viral load quantification (RNA1 copies ml^{-1}) was estimated from a standard curve consisting of 20-fold dilutions (10^1–10^{-7} RNA copies ml^{-1}) of a DNA plasmid containing RNA1 full segment of SpSsIAusc160.03.

2.4 | Stress-related gene expression

Expression of stress-modulated genes, such as the heat-shock protein 70 (*hsp*70), the glucocorticoid receptor 1 (*gr*1) and the phosphoenolpyruvate carboxykinase (*pepck*) (Kim et al., 2013), was quantified

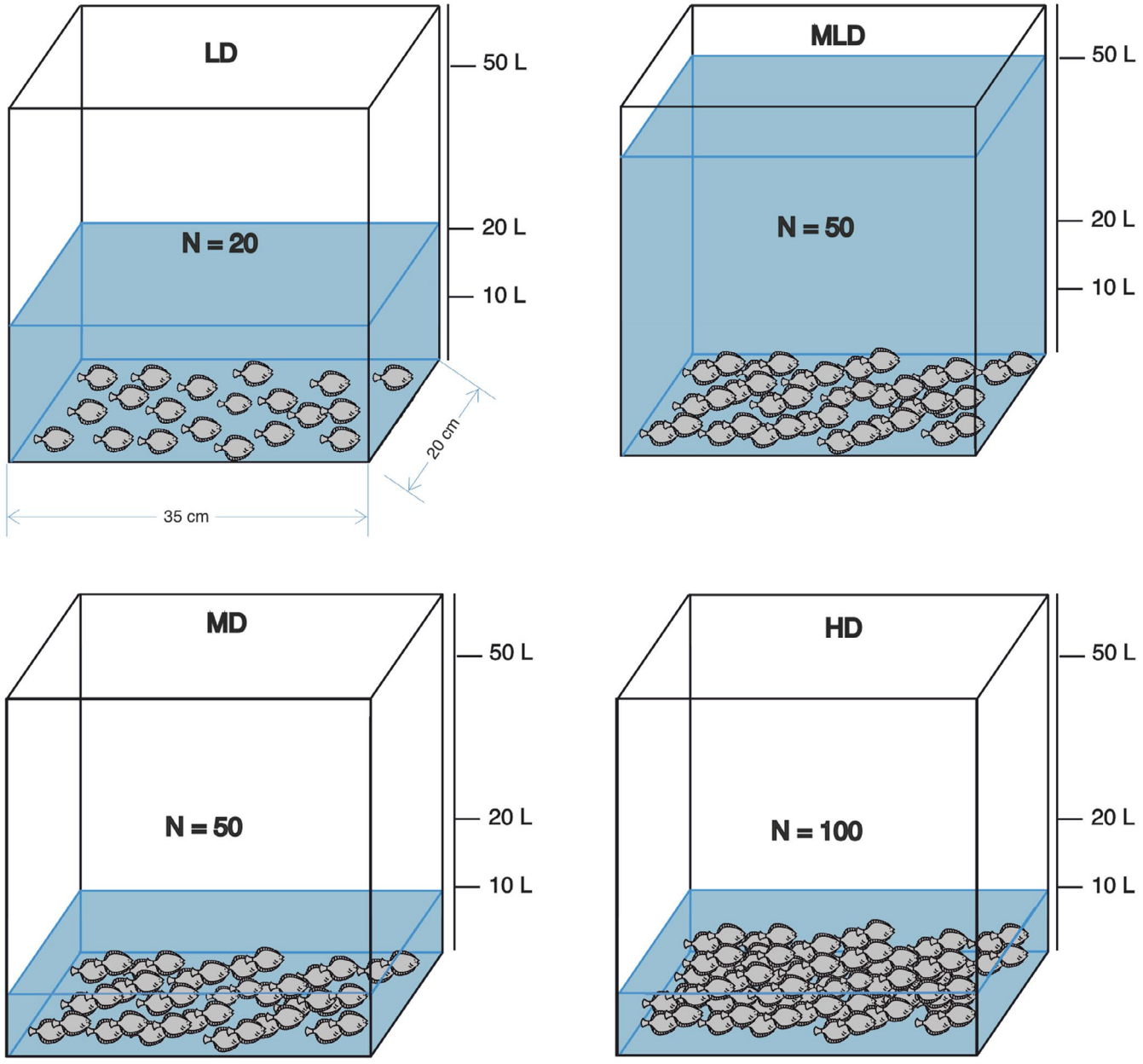


FIGURE 1 Schematic representation of the four rearing densities in the experimental infections: low density (LD: 0.028 g cm^{-2}/1 g L^{-1}), medium/low density (MLD: 0.071 g cm^{-2}/1 g L^{-1}), medium density (MD: 0.071 g cm^{-2}/5 g L^{-1}) and high density (HD: 0.142 g cm^{-2}/10 g L^{-1})

in killed and dead fish to determine whether they were subjected to any stress factors. The cDNA obtained in Section 2.3 was amplified by RT-qPCR using 200 nM of each primer set and the protocol previously described, except for the annealing–extension step (Table S1). Gene expression was normalized using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method (Livak & Schmittgen, 2001) using endogenous gene ribosomal 18S as reference and mock-challenged fish belonging to the LD group as control.

2.5 | Nitrogen compound measurement

No water exchange was performed during the challenges, so the nitrogen-derived compound concentration was monitored in the tanks allocated for water sampling and mortality assessment, at the same time points as water sampling. Total ammonia (NH_3 + NH_4^+) and nitrite (NO_2^-) contents were estimated using API® Ammonia and Nitrite Test Kits (MARS Fishcare), respectively.

2.6 | Statistics

Data were analysed using GraphPad Prism 8.1 (San Diego). Survival curves were evaluated with the Kaplan–Meier test, and differences between groups were calculated using the log-rank (Mantel–Cox) and the chi-square tests. Significant differences in viral load and *hsp*70 expression among groups were analysed using two-way ANOVA and Tukey's correction. p values <.05 are considered statistically significant.

3 | RESULTS

3.1 | Cumulative mortality and NNV quantification

The first deaths (12 and 10 fish) were observed at 1 dpi in the tanks containing the high (HD) and the medium (MD) rearing densities, respectively (Figure 2). In both groups, 50% of the fish had died by Day 17 post-infection (pi) and at the end of the experiment (35 dpi), 73% and 67% cumulative mortalities were recorded in HD and MD, respectively. In the MLD and LD challenges, mortality began on Day 12 and 26 pi, and finally reached 46% and 27%, respectively. These cumulative mortalities were significantly lower than those of the MD and HD groups (p value <.05; chi-square test). VER signs, including loop swimming, anorexia and lethargy, were observed in fish from all the density challenges from Day 10 pi onwards, except for the LD group, in which disease signs were first recorded on Day 13 pi. No VER signs were recorded in the mock-infected groups, and no viral agents were detected in the fish belonging to these groups, although two fish from HD mock-challenged groups died on the first day.

The assessment of the viral load in infected fish (Figure 3) revealed that the first individuals that succumbed to death in the low- and medium-density (LD: 26 dpi and MLD: 12 dpi) challenges showed around 10^7 copies g^{-1}/10^4 $TCID_{50}$ g^{-1}. In the LD tank, the NNV load increased slightly over time showing 1.59×10^{10} copies/2.1×10^4 $TCID_{50}$ at 31dpi (Figure 3a), whereas in the MLD tank, after decreasing between 26 and 31 dpi, the NNV load peaked on Day 32 (5×10^{10} copies g^{-1} and 1.33×10^5 $TCID_{50}$ g^{-1}) (Figure 3b). Regarding the HD and MD challenges, the individuals that died at 1 dpi carried around 6×10^6 NNV copies g^{-1} (2×10^3 $TCID_{50}$ g^{-1}). NNV load increased over time in both groups and peaked in the MD tank on Day 26 pi (6.31×10^9 copies g^{-1}/2×10^5 $TCID_{50}$ g^{-1}) (Figure 3c) and in the HD tank on Day 33 pi (9.25×10^{10} copies g^{-1}/10^8 $TCID_{50}$ g^{-1}) (Figure 3d). In the final days of the experiment, a decrease in the viral load was observed in the fish from the HD group.

3.2 | Viral load in sampled fish

Periodic sampling indicated that fish from all challenges shared a similar viral load in the first days of infection (Figure 4), but the final values were significantly higher in the HD and MD groups (9.7×10^8 and 1.5×10^9 copies, respectively), especially regarding viable particles (HD: 3.1×10^6, MD: 2.1×10^5 $TCID_{50}$), than in the LD and MLD fish (around 10^3 $TCID_{50}$). Besides, different trends were observed between the challenges throughout the trial. Thus, in Senegalese sole belonging to the LD group (Figure 4a), a progressive increase in the viral load was observed up to the 20 dpi (1.5×10^8 RNA copies/8×10^5 $TCID_{50}$) although a decrease was evident at the end of the experiment (25 dpi; 3.3×10^7 copies and 10^3 $TCID_{50}$). In the MLD and MD challenges (Figure 4b,c), viral load peaked at around 7–10 dpi (3.2×10^{10} copies/5×10^7 $TCID_{50}$ and 2.3×10^8 copies/5.6×10^6 $TCID_{50}$, respectively) to subsequently decrease until Day 25 and increase again towards the end of the experiment. In the HD tank (Figure 4d), fish sampled up to 15 dpi contained a similar number of NNV copies although a slight increase in viable particles was observed up to Day 10. At 20 dpi, a sudden 3-log increase was observed in both RNA copies and viable particles (6×10^9 and 3×10^7, respectively), but whereas the RNA values were maintained until the end of the challenge (9.8×10^8), a decrease of around 1 log was observed in the number of viable particles (3.1×10^6).

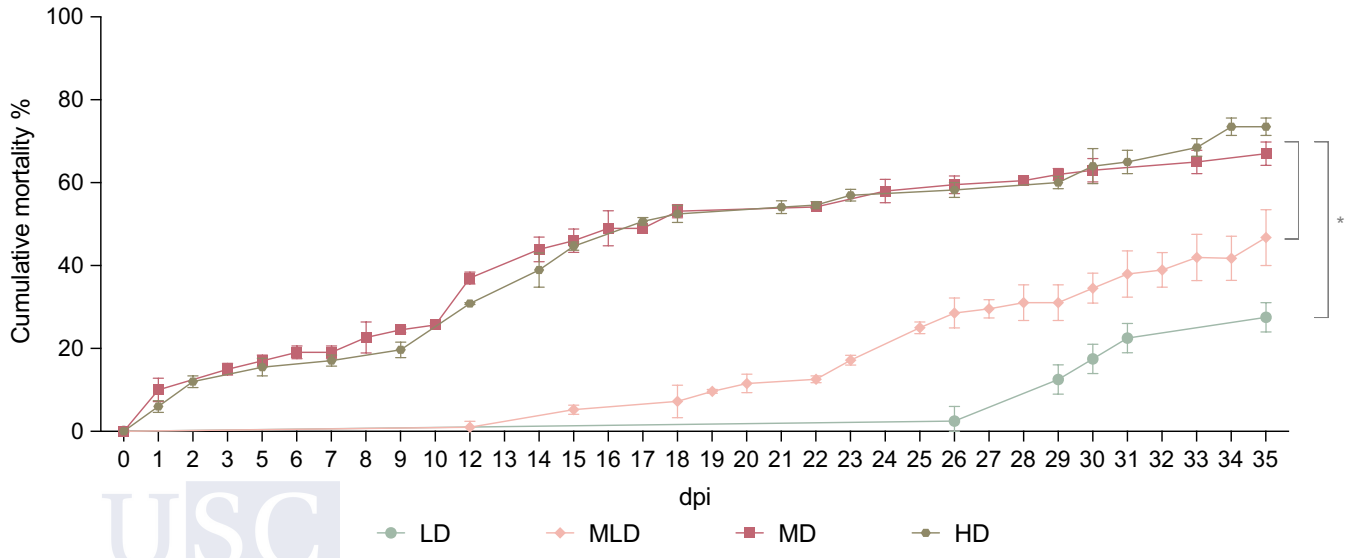


FIGURE 2 Cumulative mortality (%) recorded in Senegalese sole reared at the following densities: low, medium/low, medium and high (LD, MLD, MD and HD, respectively) for 35 days. Data are presented as mean and standard deviation (*SD*) of the replicate tanks ($N = 2$). Asterisks indicate significant differences in cumulative mortality of the highest density challenges (MD/HD) with regard to LD and MLD (p value < .05)

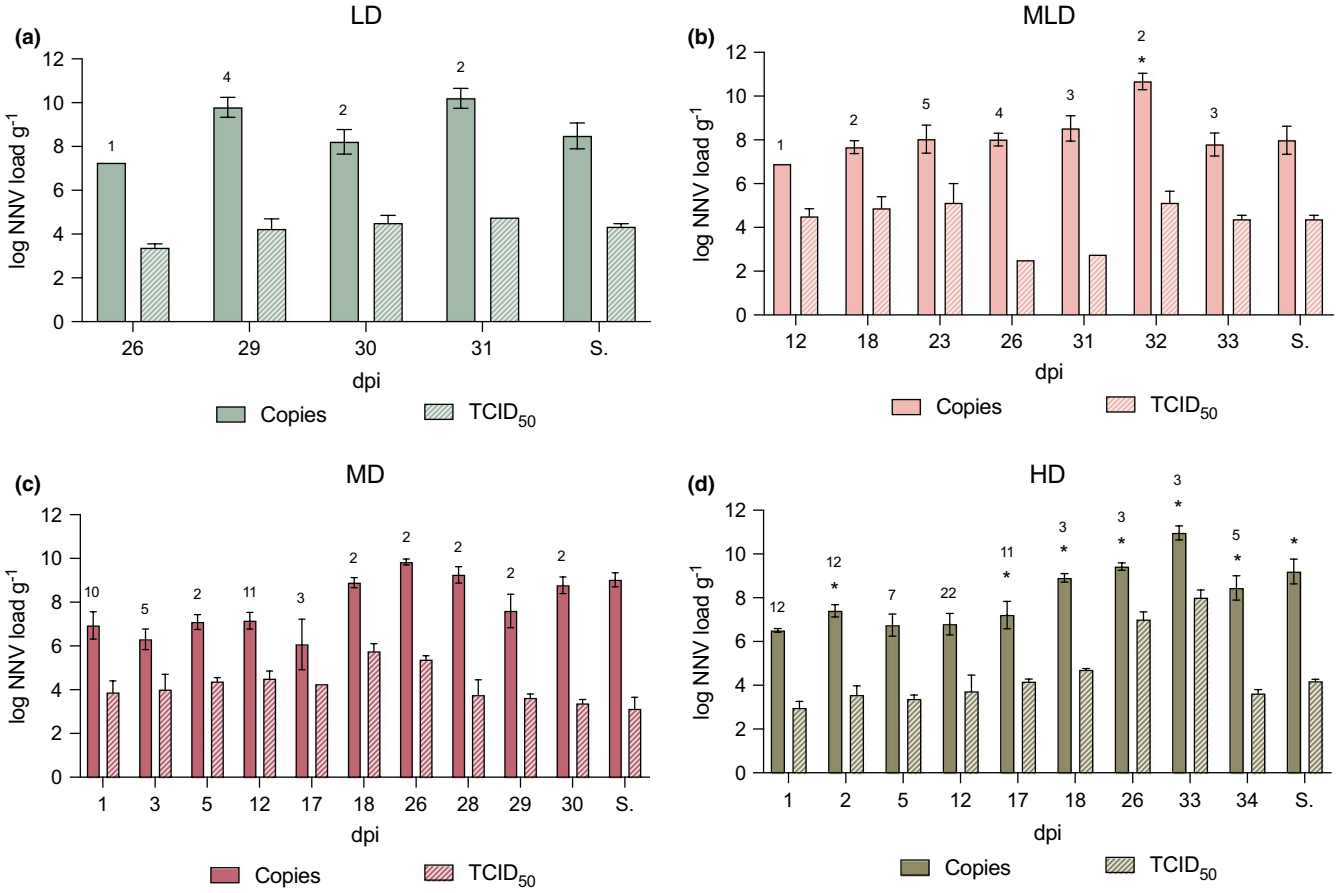


FIGURE 3 Log_{10} of NNV copies and $TCID_{50}$ in dead fish and survivors (S) from low-density (LD) (A), medium/low-density (MLD) (b), medium-density (MD) (c) and high-density (HD) (d) challenges. Dead individuals were analysed individually, and survivors were analysed in pools of 3. Number of analysed fish is indicated above each bar. Error bars represent mean ± *SD*. Asterisks indicate significant differences in viral load with respect to the first mortalities in each group (p value < .05)

3.3 | Viral load in rearing water

The initial viral load in tanks (checked at 1 hpi) was very similar in all the density challenges (average 1.5×10^5 RNA copies ml^{-1}/1.8×10^2 $TCID_{50}$ ml^{-1}), but differences were observed between the groups over the following days. In the LD group (Figure 5a), although the number of copies and titre gradually declined up to Day 5 pi (10^3 and 5.6×10^1, respectively), a slight increase in NNV copies was observed at 7 dpi (1.2×10^4) and it remained similar, albeit with a few fluctuations, until the end of the challenge. However, although it was not possible to quantify the viable virus at all the sampling time points, at the end of the experiment (35 dpi) viral titre was 3.1×10^2 $TCID_{50}$ ml^{-1}. Viral load in the MLD (Figure 5b) tank showed certain oscillations with a final increase in the number of RNA copies (from the initial 5×10^4 to 10^6) but with $TCID_{50}$ values very similar to the initial ones. NNV dynamics was similar in the water from the MD and HD tanks (Figure 5c,d), showing a gradual decline of around 1.5–2 logs up to Day 10 pi, and an abrupt increase at 15 dpi (average 2×10^6 copies ml^{-1}; 4.5×10^3 $TCID_{50}$ $ml.^{1}$) that was maintained up to Day 35 pi.

3.4 | Nitrogen-derived compound concentration

Nitrite (NO^{-2}) and total ammonia nitrogen (TAN; $NH^3 + NH_4^+$) concentration was monitored during the experiments (Table S2). Nitrite content ranged from 0 to 0.5 mg L^{-1} (0–1 mM) in water from the LD group, while in the remaining challenges, concentration increased up to 1 mg L^{-1} (20 mM) at 35 dpi. With regard to TAN, great differences were observed between the density challenges. The LD tank contained 2 mg L^{-1} of TAN at the end of the experiment, whereas a concentration of 8 mg L^{-1} was reached on days 30, 15 and 5 pi in the MLD, MD and HD groups, respectively. Further increases in TAN concentration could not be detected because of the detection limit of the test kit.

3.5 | Expression of stress-related genes

Killed fish showed *hsp*70, *gr*1 and *pepck* transcription values below 0.1 fold change throughout the experiment in all the challenges, except for the HD group, where *hsp*70 and *pepck* expression increased to 0.3 and 0.7 fold change, respectively, on Day 25 pi (Table S3A).

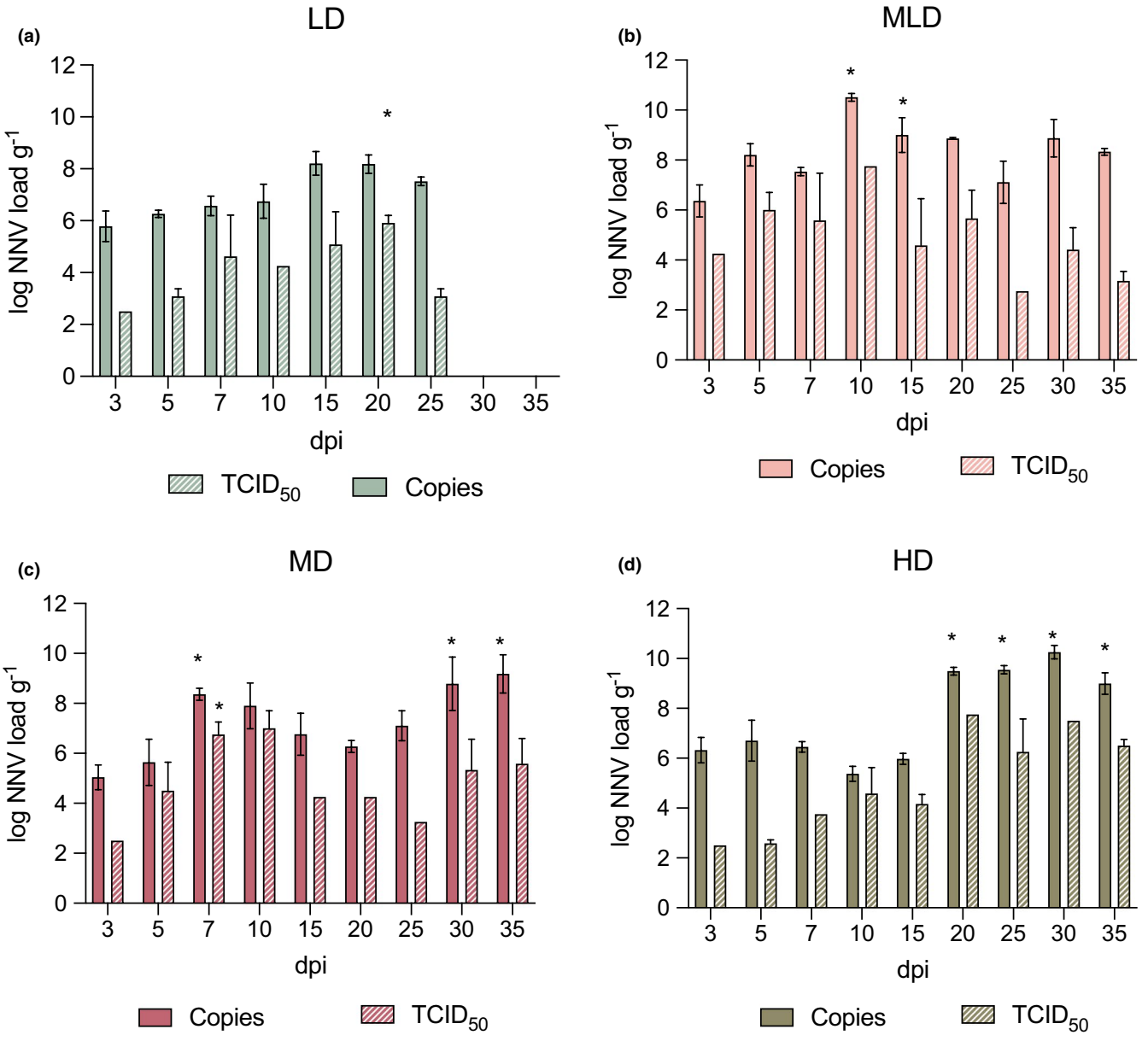


FIGURE 4 Log_{10} of NNV copies and $TCID_{50}$ values in fish sampled from low-density (LD) (a), medium/low-density (MLD) (b), medium-density (MD) (c) and high-density (HD) (d) tanks at different time points. Data represent mean ± *SD* ($n = 3$) on each point. Asterisks indicate significant differences in each group with regard to 3 dpi samples (p value < .05)

Gene transcription in dead fish was slightly higher than in the killed ones, and an average of 1.7, 3.2 and 3.36 fold change of *hsp*70, *gr*1 and *pepck* genes, respectively, was detected on Day 26 pi in fish from the HD group (Table S3B).

4 | DISCUSSION

Fish farming in aquaculture facilities is subjected to intensive culture conditions, and rearing densities are often raised to maximize the production and to meet the high demand for fish. However, increasing the fish number enhances the spread of pathogens by horizontal transmission and also induces crowding stress in fish, which can lead to a reduction in growth and an inhibition of the immune response (Iguchi et al., 2003; Salas-Leiton et al., 2010; Sánchez et al., 2010; Yarahmadi et al., 2016). Moreover, stocking density has been cited as a main factor in triggering VER outbreaks (Bandín & Souto, 2020; Munday et al., 2002). Therefore, in this work we have assessed how NNV infection in Senegalese sole juveniles, one of the species with the largest production in Mediterranean aquaculture (FAO, 2018), is affected by increasing rearing density.

Firstly, one of the major consequences of fish farming at high stocking densities is the unexpected mortality, which has been shown to be density-dependent in flatfish species as Japanese flounder larvae (*Paralichthys olivaceus*), Senegalese sole or fine flounder (*Paralichthys adspersus*) (Castro et al., 2019; Costas

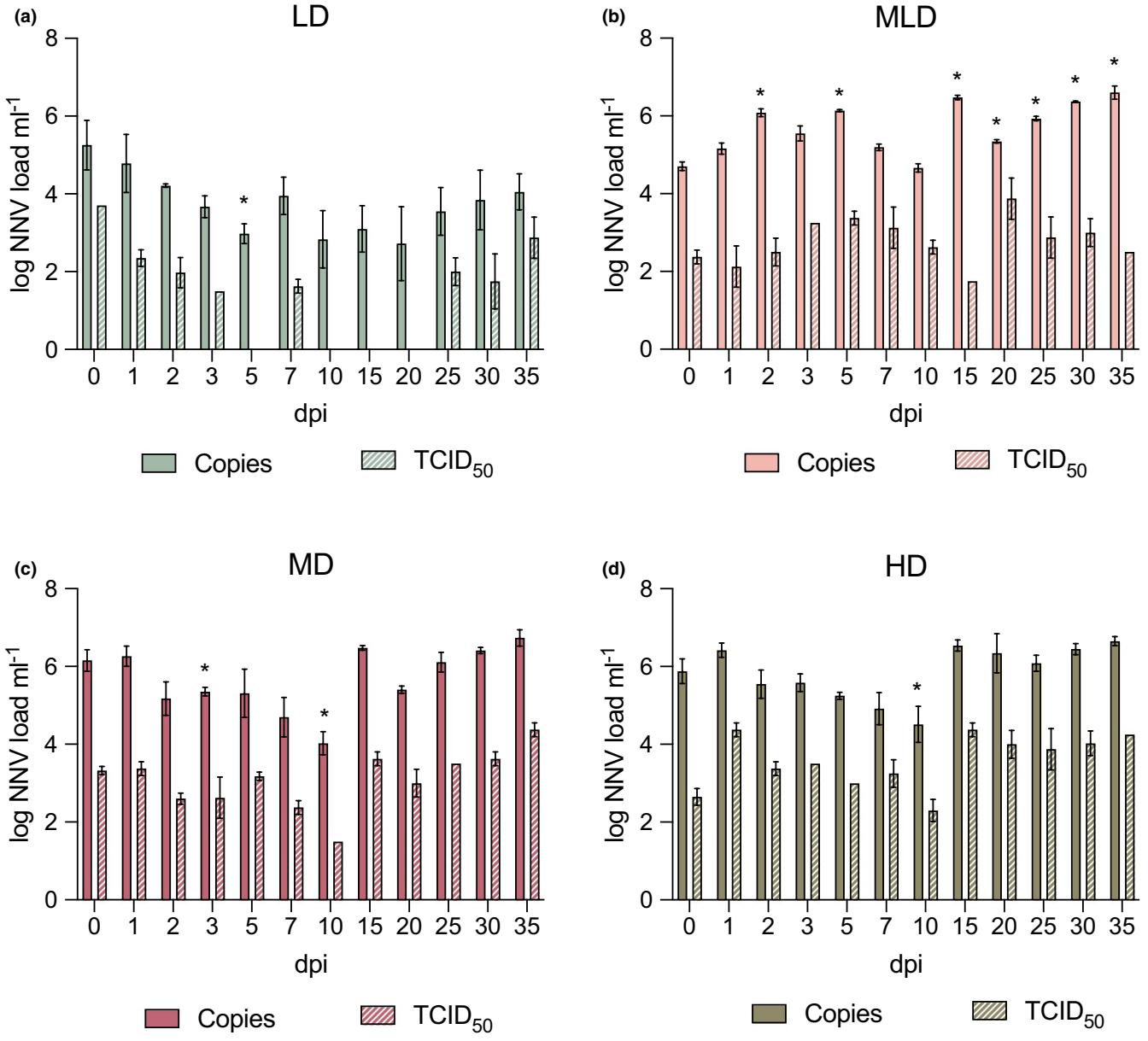


FIGURE 5 Viral load (log copies ml^{-1} and $TCID_{50}$ ml^{-1}) in rearing water from low-density (LD) (a), medium/low-density (MLD) (b), medium-density (MD) (c) and high-density (HD) (d) tanks. Data represent mean ± *SD* ($n = 3$) on each point. Asterisks indicate significant differences with regard to 3 dpi samples (p value < .05)

et al., 2008). However, in the control fish used in our study, only a 2% mortality was recorded in the first days post-infection in the HD tank. Regarding the infected fish, although mortality was expected because of NNV infection, a higher cumulative mortality was observed as rearing densities increased. In the lowest density group, 27% mortality was recorded at the end of the challenge, and a considerable increase (46%) was observed in the MLD group, which was significantly increased in the MD and HD challenges (67% and 73%, respectively). In this regard, it should be pointed out that the MLD and MD groups shared fish number per surface area (0.071 g cm^{-2}) but differed in the individuals per water volume (MD: 5 g L^{-1} and MLD: 1 g L^{-1}). These differences suggest that even though most of the aforementioned studies on flatfish provide density data based on the available surface area, the water volume is also an important parameter to take into consideration, as occurs in bilateral fish species (Sammouth et al., 2009).

Although the upper limit for optimal sole rearing densities has been set at 0.9 g cm^{-2} (Costas et al., 2008), our results indicate that rearing VER-infected Senegalese sole juveniles at densities of 0.071 g cm^{-2} (MLD group) resulted in a significantly increased mortality. Moreover, high stocking density according to both surface and water volume (0.071 g cm^{-2} and 5 g L^{-1}, MD group) resulted in a higher increase in the cumulative mortality. These findings may indicate that sole tolerance to high densities is reduced by the NNV infection.

The effect of the rearing density in NNV replication was analysed by assessing the viral load (genomic copies and viral titration) at different time points. At the beginning of the challenge, fish from all groups contained a similar viral load, but there were clear differences as the challenge progressed. From Day 20 pi onwards, the highest levels of viable virus were observed in fish belonging to the HD group. Regarding RNA copy number although high values were observed in MLD and MD groups, the highest ones were also observed in the HD group. Differences between $TCID_{50}$ and RNA values ranged from 1 to 5 logs depending on the challenge, but it must be noted that they were considerably lower in the HD challenge, which seems to indicate that high densities favour an effective viral production. Differences up to 6 logs between genome copies and viable NNV particles recovered from infected fish tissues have already been reported (Souto et al., 2015). This information was complemented with the viral load recorded in the dead fish, although in the first days of infection, data are only available for MD and HD (mortalities in the LD and MLD groups were first recorded at 12 and 26 dpi, respectively). In both groups, the viral load in the dead fish from 1 to 5 dpi was similar, just like in the killed fish, although the viral load in the MD group was more than 1 log higher than that in the sampled sole. At 26 dpi, when data were available from the four groups, the $TCID_{50}$ values were more than 2 logs higher in the fish from the MD and HD groups than in the LD group, supporting the results obtained with the sampled fish. In addition, viable virus present in water samples was, on average, 1 log higher in the MD and HD groups. All these data suggest that high stocking density conditions favoured viral replication, which can account for the observed increased mortality levels. Similar findings have been reported in infections caused by other fish viruses, such as the ranavirus largemouth bass virus (Inendino et al., 2005), the novirhabdovirus infectious haematopoietic necrosis virus (Ogut & Reno, 2004) or the golden shiner virus (Schwedler & Plumb, 1982).

To study whether the stress induced by the rearing density could be involved in the earlier deaths, we assessed the transcription of the *hsp*70, *gr*1 and *pepck* genes, well-known stress biomarkers (Kim et al., 2013). Overexpression of *hsp*70 has been previously reported in Senegalese sole subjected to different stressors (Cordeiro et al., 2012; González-Mira et al., 2016), during cohabitation with gilthead seabream (Vázquez-Salgado et al., 2021), and in individuals maintained at high stocking densities (Salas-Leiton et al., 2010). Expression of *gr*1 gene could be down- or up-regulated in adults and juveniles of different species subjected to increasing stocking densities (Kim et al., 2013; Terova et al., 2005; Valenzuela et al., 2020), while up-regulation of *pepck* has been observed in river pufferfish (*Takifugu obscurus*) adults reared at high density (Kim et al., 2013). Unlike these reports, killed sole showed no significant differences in gene transcription with respect to the control fish (low-density mock-infected group), suggesting that the density conditions assayed in our study did not provoke stress in fish. This different behaviour could be due to, on the one hand, the higher stress tolerance of flatfish (all the fish used in the above-cited studies showed bilateral symmetry) and, on the other hand, the different sizes of fish used. However, dead animals collected throughout the challenge in the high-density group showed moderate gene overexpression levels (*hsp*70: 1.7; *gr*1: 3.2; *pepck*: 3.36 fold change), which was not observed in the mock-infected fish subjected to the same density conditions. This slight up-regulation could be caused by the increased viral load observed in this group. In fact, NNV infection has been previously linked with an *hsp*70 overexpression in Asian seabass (*Lates calcarifer*) (Liu et al., 2016) and with other stress-related genes in European seabass (Lama et al., 2020).

Because the quality of the rearing water was deteriorated by the accumulation of fish waste and uneaten food pellets, nitrite and TAN contents were assessed and a density-dependent increase in both parameters was observed. Although nitrite is generally less toxic in sea water than in freshwater, several adverse effects have been reported in marine fish exposed to high nitrite concentrations (Park et al., 2013). Furthermore, up-regulation of *hsp*70 gene transcription has been reported in turbot (*Scophthalmus maximus*) and silver seabream (*Sparus sarba*) adults exposed to nitrite (Jia et al., 2015, 2016). However, *hsp*70 transcription values obtained in our study from the fish kept in the tanks with higher nitrite concentrations (20 mM; MLD, MD and HD groups) were very low, supporting the hypothesis that younger fish are more tolerant than adults to nitrite exposure, as previously reported (Ciji & Akhtar, 2020). With regard to the TAN, marine species have been reported to be more sensitive than freshwater fish, and damage in liver, gill or muscle is some of the consequences of the oxidative stress induced by ammonia (Randall & Tsui, 2002). In our study, fish did not show disease signs different to those commonly caused by NNV infection and no apparent lesions were observed in the internal organs, but since histological analysis was not performed, we cannot rule out oxidative damage in the tissues.

Finally, we also evaluated NNV dynamics in the rearing water. At the beginning of the challenge, viral particles attached to the body surface of bath-infected fish were released into the water, resulting in the detection of a high NNV load (around 10^5–10^6 NNV copies ml^{-1} and 10^3–10^4 $TCID_{50}$ ml^{-1}) in all tanks. Both genomic copies and titre progressively decreased until Day 10 pi, especially in the HD and MD challenges, to values well below the initial ones. This drop in viral load suggests that shedding from infected fish did not seem to occur in the first few days, as previously reported (Souto et al., 2018). Afterwards, viral load increased until the end of the challenge in the high-density groups (MD and HD), but not in the low-density challenges (LD and MLD). However, a different viral load was detected in the latter groups throughout the experiments, which could be explained by the fact that, although the ratio number of fish per water volume was the same, in the MLD group there were a larger number of potential shedder fish. In addition, the increase in viral load observed in the MD and HD groups coincided with the onset of clinical signs and the acute mortality phase, indicating a possible correlation of NNV load in the water with mortality peaks. This correlation has been reported in RGNNV-infected grouper (*Epinephelus septemfasciatus*) and in Asian seabass (Jaramillo et al., 2017; Nishi et al., 2016).

To conclude, our data indicated that high stocking densities not only resulted in an earlier mortality but also reduced the chances of Senegalese sole surviving an NNV infection. Moreover, the sole challenged at high densities (MD and especially at HD) carried a higher NNV load than fish from the low-density groups. We also reported a positive correlation between viral load in rearing water, the onset of clinical signs and mortality peaks. All these results highlight the risk posed by high stocking densities for the occurrence of VER episodes in fish farming facilities.

ACKNOWLEDGEMENTS

L. Vázquez-Salgado would like to thank Interreg VA Spain–Portugal cooperation Program (POCTEP) 2014-2020, 0474_BLUEBIOLAB project, co-funded by FEDER for her research contract. The authors would like to acknowledge Stolt Sea Farm S.A. for providing the fish, A. A. Silva and J. Franqueira for their contribution to sample processing, and Native English School of Languages for the language revision.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there is no conflict of interest.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

No data availability statement.

ORCID

Lucía Vázquez-Salgado https://orcid.org/0000-0002-0059-7279
Isabel Bandín https://orcid.org/0000-0002-1947-5933

REFERENCES

Bandín, I., & Souto, S. (2020). Betanodavirus and VER disease: A 30-year research review. *Pathogens*, *9*(2), 106. https://doi.org/10.3390/pathogens9020106

Castro, A., Montes, M., Orihuela, L., Linares, J., Cota, N., Carrera, L., Toledo, P., & Lazo, J. P. (2019). Effect of stocking density on growth and survival of fine flounder *Paralichthys adspersus* (Steindachner, 1867) larvae. *Latin American Journal of Aquatic Research*, *47*(1), 1–8. https://doi.org/10.3856/vol47-issue1-fulltext-1

Ciji, A., & Akhtar, M. S. (2020). Nitrite implications and its management strategies in aquaculture: A review. *Reviews in Aquaculture*, *12*(2), 878–908. https://doi.org/10.1111/raq.12354

Cordeiro, O. D., Silva, T. S., Alves, R. N., Costas, B., Wulff, T., Richard, N., de Vareilles, M., Conceição, L. E. C., & Rodrigues, P. M. (2012). Changes in liver proteome expression of Senegalese sole (*Solea senegalensis*) in response to repeated handling stress. *Marine Biotechnology*, *14*(6), 714–729. https://doi.org/10.1007/s10126-012-9437-4

Costas, B., Aragão, C., Mancera, J. M., Dinis, M. T., Conceição, L. E. C., & Refojos, B. C. (2008). High stocking density induces crowding stress and affects amino acid metabolism in Senegalese sole *Solea senegalensis* (Kaup 1858) juveniles. *Aquaculture Research*, *39*(1), 1–9. https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2007.01845.x

FAO (2018). El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2018. Cumplir los objetivos de desarrollo sostenible. CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

González-Mira, A., Varó, I., Solé, M., & Torreblanca, A. (2016). Drugs of environmental concern modify *Solea senegalensis* physiology and biochemistry in a temperature-dependent manner. *Environmental Science and Pollution Research*, *23*(20), 20937–20951. https://doi.org/10.1007/s11356-016-7293-x

Iguchi, K., Ogawa, K., Nagae, M., & Ito, F. (2003). The influence of rearing density on stress response and disease susceptibility of ayu (*Plecoglossus altivelis*). *Aquaculture*, *220*(1–4), 515–523. https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00626-9

Inendino, K. R., Grant, E. C., Philipp, D. P., & Goldberg, T. L. (2005). Effects of factors related to water quality and population density on the sensitivity of juvenile largemouth bass to mortality induced by viral infection. *Journal of Aquatic Animal Health*, *17*(4), 304–314. https://doi.org/10.1577/H04-028.1

Jaramillo, D., Hick, P., & Whittington, R. J. (2017). Age dependency of nervous necrosis virus infection in barramundi *Lates calcarifer* (Bloch). *Journal of Fish Diseases*, *40*(8), 1089–1101. https://doi.org/10.1111/jfd.12584

Jia, R., Han, C., Lei, J. L., Liu, B. L., Huang, B., Huo, H. H., & Yin, S. T. (2015). Effects of nitrite exposure on haematological parameters, oxidative stress and apoptosis in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquatic Toxicology*, *169*, 1–9. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.09.016

Jia, R., Liu, B. L., Han, C., Huang, B., & Lei, J. L. (2016). The physiological performance and immune response of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*) to nitrite exposure. *Comparative Biochemistry and Physiology Part - C*, *181–182*, 40–46. https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2016.01.002

Kim, J. H., Dahms, H. U., & Han, K. N. (2013). Biomonitoring of the river pufferfish, *Takifugu obscurus* in aquaculture at different rearing densities using stress-related genes. *Aquaculture Research*, *44*(12), 1835–1846. https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2012.03189.x

Lama, R., Pereiro, P., Valenzuela-Muñoz, V., Gallardo-Escárate, C., Tort, L., Figueras, A., & Novoa, B. (2020). RNA-Seq analysis of European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) infected with nodavirus reveals powerful modulation of the stress response. *Veterinary Research*, *51*(1), 1–22. https://doi.org/10.1186/s13567-020-00784-y

Liu, P., Wang, L., Kwang, J., Yue, G. H., & Wong, S. M. (2016). Transcriptome analysis of genes responding to NNV infection in Asian seabass epithelial cells. *Fish and Shellfish Immunology*, *54*, 342–352. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.04.029

Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-ΔΔCT method. *Methods*, *25*(4), 402–408. https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262

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. https://doi.org/10.1016/0042-6822(92)90329-N

Munday, B. L., Kwang, J., & Moody, N. (2002). Review article Betanodavirus infections of teleost fish: A review. *Journal of Fish Diseases*, *127–142*, https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.2002.00350.x

Nishi, S., Yamashita, H., Kawato, Y., & Nakai, T. (2016). Cell culture isolation of Piscine nodavirus (Betanodavirus) in fish-rearing seawater. *Applied and Environmental Microbiology*, *82*(8), 2537–2544. https://doi.org/10.1128/AEM.03834-15.Editor

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. https://doi.org/10.1128/aem.63.4.1633-1636.1997

Ogut, H., & Reno, P. W. (2004). Effects of fish density on spread of infectious hematopoietic necrosis virus (INHV) in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *The Israeli Journal of Aquaculture*, *563*(January), 218–225.

Olveira, J. G., Souto, S., Dopazo, C. P., & Bandín, I. (2013). Isolation of betanodavirus from farmed turbot *Psetta maxima* showing no signs of viral encephalopathy and retinopathy. *Aquaculture*, *406–407*, 125–130. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.05.007

Olveira, J. G., Souto, S., Dopazo, C. P., Thiéry, R., Barja, J. L., & Bandín, I. (2009). Comparative analysis of both genomic segments of

betanodaviruses isolated from epizootic outbreaks in farmed fish species provides evidence for genetic reassortment. *Journal of General Virology*, *90*(12), 2940–2951. https://doi.org/10.1099/vir.0.013912-0

Panzarin, V., Fusaro, A., Monne, I., Cappellozza, E., Patarnello, P., Bovo, G., Capua, I., Holmes, E. C., & Cattoli, G. (2012). Molecular epidemiology and evolutionary dynamics of betanodavirus in southern Europe. *Infection, Genetics and Evolution*, *12*(1), 63–70. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.10.007

Park, J., Daniels, H. V., & Cho, S. H. (2013). Nitrite toxicity and methemoglobin changes in southern flounder, *Paralichthys lethostigma*, in brackish water. *Journal of the World Aquaculture Society*, *44*(5), 726–734. https://doi.org/10.1111/jwas.12064

Randall, D. J., & Tsui, T. (2002). Ammonia toxicity in fish. *Marine Pollution Bulletin*, *45*, 17–23. https://doi.org/10.1016/s1095-6433(99)90247-7

Reed, L. J., & Muench, H. (1938). A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *The American Journal of Hygiene*, *27*, 493–497.

Salas-Leiton, E., Anguis, V., Martín-Antonio, B., Crespo, D., Planas, J. V., Infante, C., Cañavate, J. P., & Manchado, M. (2010). Effects of stocking density and feed ration on growth and gene expression in the Senegalese sole (*Solea senegalensis*): Potential effects on the immune response. *Fish and Shellfish Immunology*, *28*(2), 296–302. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2009.11.006

Sammouth, S., d'Orbcastel, E. R., Gasset, E., Lemarié, G., Breuil, G., Marino, G., Coeurdacier, J. L., Fivelstad, S., & Blancheton, J. P. (2009). The effect of density on sea bass (*Dicentrarchus labrax*) performance in a tank-based recirculating system. *Aquacultural Engineering*, *40*(2), 72–78. https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2008.11.004

Sánchez, P., Ambrosio, P. P., & Flos, R. (2010). Stocking density and sex influence individual growth of Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Aquaculture*, *300*(1–4), 93–101. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.12.013

Schwedler, T. E., & Plumb, J. A. (1982). Golden shiner virus: Effects of stocking density on incidence of viral infection. *The Progressive Fish-Culturist*, *44*(3), 151–152. 10.1577/1548-8659(1982)44[151:GSV]2.0.CO;2

Souto, S., Lopez-Jimena, B., Alonso, M. C., García-Rosado, E., & Bandín, I. (2015). Experimental susceptibility of European sea bass and Senegalese sole to different betanodavirus isolates. *Veterinary Microbiology*, *177*(1–2), 53–61. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.02.030

Souto, S., Olveira, J. G., Alonso, M. C., Dopazo, C. P., & Bandín, I. (2018). Betanodavirus infection in bath-challenged *Solea senegalensis* juveniles: A comparative analysis of RGNNV, SJNNV and reassortant strains. *Journal of Fish Diseases*, *41*, 1571–1578. https://doi.org/10.1111/jfd.12865

Terova, G., Gornati, R., Rimoldi, S., Bernardini, G., & Saroglia, M. (2005). Quantification of a glucocorticoid receptor in sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) reared at high stocking density. *Gene*, *357*(2), 144–151. https://doi.org/10.1016/j.gene.2005.06.016

Toffan, A., Pascoli, F., Pretto, T., Panzarin, V., Abbadi, M., Buratin, A., Quartesan, R., Gijón, D., & Padrós, F. (2017). Viral nervous necrosis in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) caused by reassortant betanodavirus RGNNV/SJNNV: An emerging threat for Mediterranean aquaculture. *Scientific Reports*, *7*, 46755. https://doi.org/10.1038/srep46755

Toffolo, V., Negrisolo, E., Maltese, C., Bovo, G., Belvedere, P., Colombo, L., & Dalla Valle, L. (2007). Phylogeny of betanodaviruses and molecular evolution of their RNA polymerase and coat proteins. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *43*(1), 298–308. https://doi.org/10.1016/j.ympev.2006.08.003

Tort, L. (2011). Stress and immune modulation in fish. *Developmental and Comparative Immunology*, *35*(12), 1366–1375. https://doi.org/10.1016/j.dci.2011.07.002

Valenzuela, C. A., Ponce, C., Zuloaga, R., González, P., Avendaño-Herrera, R., Valdés, J. A., & Molina, A. (2020). Effects of crowding on the three main proteolytic mechanisms of skeletal muscle in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *BMC Veterinary Research*, *16*(1), 1–12. https://doi.org/10.1186/s12917-020-02518-w

Vázquez-Salgado, L., Olveira, J. G., Dopazo, C. P., & Bandín, I. (2021). Interspecies transmission of reassortant Nervous Necrosis Virus (NNV) strains and effect of the stress on the outcome of the infection. *Aquaculture* (under review).

Volpe, E., Gustinelli, A., Caffara, M., Errani, F., Quaglio, F., Fioravanti, M. L., & Ciulli, S. (2020). Viral nervous necrosis outbreaks caused by the RGNNV/SJNNV reassortant betanodavirus in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*, *523*(February), 735155. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735155

Yarahmadi, P., Miandare, H. K., Fayaz, S., & Caipang, C. M. A. (2016). Increased stocking density causes changes in expression of selected stress- and immune-related genes, humoral innate immune parameters and stress responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish and Shellfish Immunology*, *48*, 43–53. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.11.007

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section.

How to cite this article: Vázquez-Salgado, L., Olveira, J. G., Dopazo, C. P., & Bandín, I. (2021). Effect of rearing density on nervous necrosis virus infection in Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Journal of Fish Diseases*, 44, 2003–2012. https://doi.org/10.1111/jfd.13514

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

JOHN WILEY AND SONS LICENSE
TERMS AND CONDITIONS

Jul 01, 2022

This Agreement between Mrs. Lucía Vázquez ("You") and John Wiley and Sons ("John Wiley and Sons") consists of your license details and the terms and conditions provided by John Wiley and Sons and Copyright Clearance Center.

License Number	5340111484604
License date	Jul 01, 2022
Licensed Content Publisher	John Wiley and Sons
Licensed Content Publication	Journal of Fish Diseases
Licensed Content Title	Nervous necrosis virus viability modulation by water salinity and temperature
Licensed Content Author	Lucia Vázquez-Salgado, Jose G. Olveira, Isabel Bandín
Licensed Content Date	Jan 10, 2022
Licensed Content Volume	45
Licensed Content Issue	4
Licensed Content Pages	8
Type of use	Dissertation/Thesis
Requestor type	Author of this Wiley article
Format	Print and electronic

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Portion	Full article
Will you be translating?	Yes, including English rights
Number of languages	1
Title	Epidemiología y Patogenicidad de betanodavirus
Institution name	Universidade de Santiago de Compostela
Expected presentation date	Oct 2022
Specific Languages	Spanish
Requestor Location	Mrs. Lucía Vázquez Rúa Constantino Candeira, s/n Santiago de Compostela, 15705 Spain Attn: Salgado
Publisher Tax ID	EU826007151
Total	0.00 EUR
Terms and Conditions	

TERMS AND CONDITIONS

This copyrighted material is owned by or exclusively licensed to John Wiley & Sons, Inc. or one of its group companies (each a"Wiley Company") or handled on behalf of a society with which a Wiley Company has exclusive publishing rights in relation to a particular work (collectively "WILEY"). By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the billing and payment terms and conditions established by the Copyright Clearance Center Inc., ("CCC's Billing and Payment terms and conditions"), at the time that you opened your RightsLink account (these are available at any time at http://myaccount.copyright.com).

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Terms and Conditions

- The materials you have requested permission to reproduce or reuse (the "Wiley Materials") are protected by copyright.

- You are hereby granted a personal, non-exclusive, non-sub licensable (on a stand-alone basis), non-transferable, worldwide, limited license to reproduce the Wiley Materials for the purpose specified in the licensing process. This license, **and any CONTENT (PDF or image file) purchased as part of your order,** is for a one-time use only and limited to any maximum distribution number specified in the license. The first instance of republication or reuse granted by this license must be completed within two years of the date of the grant of this license (although copies prepared before the end date may be distributed thereafter). The Wiley Materials shall not be used in any other manner or for any other purpose, beyond what is granted in the license. Permission is granted subject to an appropriate acknowledgement given to the author, title of the material/book/journal and the publisher. You shall also duplicate the copyright notice that appears in the Wiley publication in your use of the Wiley Material. Permission is also granted on the understanding that nowhere in the text is a previously published source acknowledged for all or part of this Wiley Material. Any third party content is expressly excluded from this permission.

- With respect to the Wiley Materials, all rights are reserved. Except as expressly granted by the terms of the license, no part of the Wiley Materials may be copied, modified, adapted (except for minor reformatting required by the new Publication), translated, reproduced, transferred or distributed, in any form or by any means, and no derivative works may be made based on the Wiley Materials without the prior permission of the respective copyright owner.**For STM Signatory Publishers clearing permission under the terms of the STM Permissions Guidelines only, the terms of the license are extended to include subsequent editions and for editions in other languages, provided such editions are for the work as a whole in situ and does not involve the separate exploitation of the permitted figures or extracts,** You may not alter, remove or suppress in any manner any copyright, trademark or other notices displayed by the Wiley Materials. You may not license, rent, sell, loan, lease, pledge, offer as security, transfer or assign the Wiley Materials on a stand-alone basis, or any of the rights granted to you hereunder to any other person.

- The Wiley Materials and all of the intellectual property rights therein shall at all times remain the exclusive property of John Wiley & Sons Inc, the Wiley Companies, or their respective licensors, and your interest therein is only that of having possession of and the right to reproduce the Wiley Materials pursuant to Section 2 herein during the continuance of this Agreement. You agree that you own no right, title or interest in or to the Wiley Materials or any of the intellectual property rights therein. You shall have no rights hereunder other than the license as provided for above in Section 2. No right, license or interest to any trademark, trade name, service mark or other branding ("Marks") of WILEY or its licensors is granted hereunder, and you agree that you shall not assert any such right, license or interest with respect thereto

- NEITHER WILEY NOR ITS LICENSORS MAKES ANY WARRANTY OR REPRESENTATION OF ANY KIND TO YOU OR ANY THIRD PARTY, EXPRESS, IMPLIED OR STATUTORY, WITH RESPECT TO THE MATERIALS OR THE ACCURACY OF ANY INFORMATION CONTAINED IN THE MATERIALS, INCLUDING, WITHOUT LIMITATION, ANY IMPLIED WARRANTY OF MERCHANTABILITY, ACCURACY, SATISFACTORY QUALITY, FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE, USABILITY, INTEGRATION OR NON-INFRINGEMENT AND ALL SUCH WARRANTIES ARE HEREBY EXCLUDED BY WILEY AND ITS LICENSORS AND WAIVED BY YOU.

- WILEY shall have the right to terminate this Agreement immediately upon breach of this Agreement by you.

- You shall indemnify, defend and hold harmless WILEY, its Licensors and their respective directors, officers, agents and employees, from and against any actual or

threatened claims, demands, causes of action or proceedings arising from any breach of this Agreement by you.

- IN NO EVENT SHALL WILEY OR ITS LICENSORS BE LIABLE TO YOU OR ANY OTHER PARTY OR ANY OTHER PERSON OR ENTITY FOR ANY SPECIAL, CONSEQUENTIAL, INCIDENTAL, INDIRECT, EXEMPLARY OR PUNITIVE DAMAGES, HOWEVER CAUSED, ARISING OUT OF OR IN CONNECTION WITH THE DOWNLOADING, PROVISIONING, VIEWING OR USE OF THE MATERIALS REGARDLESS OF THE FORM OF ACTION, WHETHER FOR BREACH OF CONTRACT, BREACH OF WARRANTY, TORT, NEGLIGENCE, INFRINGEMENT OR OTHERWISE (INCLUDING, WITHOUT LIMITATION, DAMAGES BASED ON LOSS OF PROFITS, DATA, FILES, USE, BUSINESS OPPORTUNITY OR CLAIMS OF THIRD PARTIES), AND WHETHER OR NOT THE PARTY HAS BEEN ADVISED OF THE POSSIBILITY OF SUCH DAMAGES. THIS LIMITATION SHALL APPLY NOTWITHSTANDING ANY FAILURE OF ESSENTIAL PURPOSE OF ANY LIMITED REMEDY PROVIDED HEREIN.

- Should any provision of this Agreement be held by a court of competent jurisdiction to be illegal, invalid, or unenforceable, that provision shall be deemed amended to achieve as nearly as possible the same economic effect as the original provision, and the legality, validity and enforceability of the remaining provisions of this Agreement shall not be affected or impaired thereby.

- The failure of either party to enforce any term or condition of this Agreement shall not constitute a waiver of either party's right to enforce each and every term and condition of this Agreement. No breach under this agreement shall be deemed waived or excused by either party unless such waiver or consent is in writing signed by the party granting such waiver or consent. The waiver by or consent of a party to a breach of any provision of this Agreement shall not operate or be construed as a waiver of or consent to any other or subsequent breach by such other party.

- This Agreement may not be assigned (including by operation of law or otherwise) by you without WILEY's prior written consent.

- Any fee required for this permission shall be non-refundable after thirty (30) days from receipt by the CCC.

- These terms and conditions together with CCC's Billing and Payment terms and conditions (which are incorporated herein) form the entire agreement between you and WILEY concerning this licensing transaction and (in the absence of fraud) supersedes all prior agreements and representations of the parties, oral or written. This Agreement may not be amended except in writing signed by both parties. This Agreement shall be binding upon and inure to the benefit of the parties' successors, legal representatives, and authorized assigns.

- In the event of any conflict between your obligations established by these terms and conditions and those established by CCC's Billing and Payment terms and conditions, these terms and conditions shall prevail.

- WILEY expressly reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.

- This Agreement will be void if the Type of Use, Format, Circulation, or Requestor Type was misrepresented during the licensing process.

- This Agreement shall be governed by and construed in accordance with the laws of the State of New York, USA, without regards to such state's conflict of law rules. Any legal action, suit or proceeding arising out of or relating to these Terms and Conditions or the breach thereof shall be instituted in a court of competent jurisdiction in New York County in the State of New York in the United States of America and each party hereby consents and submits to the personal jurisdiction of such court, waives any objection to venue in such court and consents to service of process by registered or certified mail, return receipt requested, at the last known address of such party.

WILEY OPEN ACCESS TERMS AND CONDITIONS

Wiley Publishes Open Access Articles in fully Open Access Journals and in Subscription journals offering Online Open. Although most of the fully Open Access journals publish open access articles under the terms of the Creative Commons Attribution (CC BY) License only, the subscription journals and a few of the Open Access Journals offer a choice of Creative Commons Licenses. The license type is clearly identified on the article.

The Creative Commons Attribution License

The Creative Commons Attribution License (CC-BY) allows users to copy, distribute and transmit an article, adapt the article and make commercial use of the article. The CC-BY license permits commercial and non-

Creative Commons Attribution Non-Commercial License

The Creative Commons Attribution Non-Commercial (CC-BY-NC)License permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.(see below)

Creative Commons Attribution-Non-Commercial-NoDerivs License

The Creative Commons Attribution Non-Commercial-NoDerivs License (CC-BY-NC-ND) permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited, is not used for commercial purposes and no modifications or adaptations are made. (see below)

Use by commercial "for-profit" organizations

Use of Wiley Open Access articles for commercial, promotional, or marketing purposes requires further explicit permission from Wiley and will be subject to a fee.

Further details can be found on Wiley Online Library
http://olabout.wiley.com/WileyCDA/Section/id-410895.html

Other Terms and Conditions:

USC
UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

v1.10 Last updated September 2015

Questions? customercare@copyright.com or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Check for updates

Received: 2 November 2021 | Revised: 23 December 2021 | Accepted: 29 December 2021

DOI: 10.1111/jfd.13581

Journal of Fish Diseases WILEY

RESEARCH ARTICLE

Nervous necrosis virus viability modulation by water salinity and temperature

Lucia Vázquez-Salgado | Jose G. Olveira | Isabel Bandín

Instituto de Acuicultura, Departamento de Microbiología y Parasitología, Universidade de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain

Correspondence
Isabel Bandín, Instituto de Acuicultura, Departamento de Microbiología y Parasitología – Universidade de Santiago de Compostela, 15706, Santiago de Compostela, Spain.
Email: isabel.bandin@usc.es

Funding information
Interreg VA Spain-Portugal cooperation program (POCTEP) 2014-2020, 0474_BLUEBIOLAB

Abstract

Nervous necrosis virus (NNV) is a hazardous aquatic pathogen, distributed worldwide and in a wide range of temperatures. Viral persistence in water has been demonstrated to be affected by different factors, such as temperature, UV, or biological load. In this study, we have investigated the viability of NNV strains in low- and high-salinity seawater (LS and HS, respectively) both in laboratory and aquarium conditions, at different storage temperatures, and for comparative purposes, in culture medium. Our results showed the highest NNV viability in seawater at 15°C and as temperature increased, a drop in viral persistence was observed. Additionally, survival at 15 and 30°C was strongly affected by increasing salt content, while no differences were observed between LS and HS groups at 20 and 25°C. The results of the incubation under aquarium conditions indicated that the effect of UV light and oxygen exposure accelerate the inactivation of infective particles. According to previous studies, NNV persistence in cell culture medium was higher than in seawater, and as observed in the latter, increasing incubation temperatures led to a decrease in viral survival.

KEYWORDS
nervous necrosis virus, salinity, temperature, viability, viral load

1 | INTRODUCTION

Viral encephalopathy and retinopathy (VER) is a serious and common disease of marine farmed but also wild fish. The causative agent, the nervous necrosis virus (NNV), is a positive-sense and bisegmented RNA virus. Segment 1, namely, RNA1, codes for the RNA polymerase RNA-dependent (RpRd) and contains the region responsible for temperature adaptation (Hata et al., 2010). Segment 2 (RNA2) encodes the capsid protein and holds the T4 region, which is used for the current classification into four genotypes: Barfin flounder-, Redspotted grouper-, Striped jack-, and Tiger puffer nervous necrosis virus (BFNNV, RGNNV, SJNNV, and TPNNV, respectively) (Nishizawa et al., 1997). Moreover, VER episodes in Southern Europe led to the discovery of genetic reassortment between RGNNV and SJNNV (RGNNV/SJNNV and SJNNV/RGNNV; Olveira et al., 2009; Panzarin et al., 2012; Toffan et al., 2017; Toffolo et al., 2007). NNV genotypes are geographically distributed regarding their thermotolerance. BFNNV is reported in cold water fish (4–15°C) from Japan and Northern European and American waters, whereas TPNNV was detected in Japan at around 20°C. SJNNV is isolated at mild temperatures (20–25°C) in fish mainly from Japan but also in the Iberian Peninsula, and RGNNV is the widest distributed genotype detected at temperatures ranging from 23 to 30°C in Mediterranean, Asian, and Australian waters (Bandín & Souto, 2020).

Although an increase in sea temperatures could favour VER outbreaks in areas where it is currently not a problem, temperature is

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.
© 2022 The Authors. *Journal of Fish Diseases* published by John Wiley & Sons Ltd.

one of the parameters that most affects viral viability. Enveloped virus, like infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) or viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) have been reported to suffer a 99% decrease of infective particles in a time span below 2 weeks in seawater at temperatures above 15°C and 4°C, respectively (Oidtmann et al., 2018). On the contrary, non-enveloped virus seem to be less affected by temperature increase; in fact, infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) is one of the most stable, showing less than 1% inactivation for 150 days at 4°C (Oidtmann et al., 2018). Therefore, the aim of this study was to assess the viability in marine water of three NNV strains belonging to the genotypes detected in Southern Europe. Different conditions including temperature and salinity were studied (Table 1), and viral viability was compared with that in cell culture medium.

2 | METHODOLOGY

2.1 | Viral strains production

The NNV strains used in this study were SpSs-IAusc160.03 (an RGNNV/SJNNV reassortant, hereafter RG/SJ), SpDI-IAusc965.08 (typed as RGNNV, hereafter RGNNV), and SJNag93 (belonging to the SJNNV genotype, hereafter SJNNV). Strains were propagated at a MOI of 0.1 in semiconfluent E-11 cell monolayers (Iwamoto et al., 2000), grown in Leibovit'z-15 Medium (L-15; Gibco, Fisher Scientific) supplemented with 5% foetal bovine serum. Cultures were incubated at 25°C and checked daily for cytopathic effect (CPE). Cell suspensions containing viral particles were collected and clarified by centrifugation at 3000 × *g* for 15 min. Titration was accomplished by inoculating 10-fold dilutions of each viral strain onto semiconfluent E-11 monolayers in 96-well plates. Results were expressed as the tissue culture infective dose ($TCID_{50}$ ml^{-1}), following the method described by Reed and Muench (1938).

2.2 | Water treatments and incubation assays

NNV viability was assayed in seawater, both under laboratory and aquarium conditions, and in L-15 culture medium, as follows:

Viability in seawater under laboratory conditions. Seawater was collected from the Atlantic coast of Galicia (low salinity; LS: 33 ± 0.2 g L^{-1}) and from the Mediterranean Sea (high salinity; HS: 39 ± 0.2 g L^{-1}) and stored at 4°C until use. Salinity was measured using a Hand-Held refractometer (ATAGO). Prior to the assays, water was filtered using Sartorius gridded sterile cellulose nitrate membrane filters, with a pore size of 0.2 μm (Fisher Scientific, Göttingen, Germany). Each NNV strain was inoculated in triplicate in 250-ml capped glass bottles containing LS-seawater, and for comparative purposes, the RG/SJ strain was also inoculated in the HS-seawater.

Viability in seawater under aquarium conditions. The RG/SJ strain was incubated in triplicate in open opaque 50-l tanks from the aquarium of the University of Santiago de Compostela containing LS-seawater. To simulate the conditions for the in vivo assays, viral strains were incubated with aeration.

Viability in culture medium (L-15). The three NNV strains were inoculated in triplicate in 250-ml glass closed/capped bottles containing sterile L-15 culture medium.

Viral concentration at the beginning of all assays was 10^6 $TCID_{50}$ ml^{-1}. Incubations were performed at 15, 20, 25, and 30 ± 1°C, in darkness, except for those conducted in aquarium conditions, in which temperature was set at 25°C and with the photoperiod established in the facilities (12:12).

For all assays, a 5 ml aliquot was sampled at the beginning of the experiment (1 h post-acclimatization/0 days post-inoculation -dpi-). Then, samples from the aquarium experiment were collected daily up to 7 dpi, while the salinity assays (HS and LS) and the incubation in cell culture medium were sampled weekly up to 119 or 140 dpi, respectively. After removal, no additional seawater or medium was

TABLE 1 Main parameters affecting the viability of NNV in seawater described in the literature

Virus	Assay conditions
Strain[a]	Matrix
Genotype[b]	Seawater: Artificial/Natural[a]
	Treatment:
	Filtered[b]
	Autoclaved
	Salinity[a]
	Microbiota[b]
	System
	Capped – uncapped[b]
	UV – sunlight exposure[b]
	Temperature[b]
	Incubation time[b]

[a]Previously studied and also assessed in this study.

[b]Only assessed in this study.

added to the experimental incubations. Seawater samples were filtered by 0.2 μm, as previously described, prior to the quantification of viral load.

2.3 | Viral load assessment: $TCID_{50}$ and RNA1 copies ml^{-1}

Samples from all assays and sampling points were analysed for viral load quantification.

Quantification of viable viral particles was accomplished by the end-point dilution method as described in Section 2.1, whereas genome copy number was quantified by RT-qPCR. Total RNA was extracted using a Nucleospin RNA ® Kit (Macherey-Nagel) as indicated by the manufacturer. RNA was reverse transcribed using a RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermoscientific Inc.), by means of an incubation with 200 nM of random primers and the reverse transcription mixture for 5 min at 95°C and 1 hr at 42°C, respectively. Enzyme inactivation was performed for 10 min at 70°C. The obtained cDNA (2 μl) was amplified by RT-qPCR in a CFX-96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) using 200 nM of SnodR1 F/R primers (5′-TCCAAAAGAAAGAAGCATAC-3′/5′-TGGCATGTAC CACGGAAC-3′; Olveira et al., 2013) and 10 μl of iQ ™ SYBR ® Green Supermix (Bio-Rad), under the following thermal profile: 3 min, 95°C and 40 × (15 s, 95°C/20 s, 59°C). The RNA1 copy number was estimated using a standard curve based on 20-fold dilutions of a plasmid containing an SpSs-IAusc160.03 RNA1 full-segment.

2.4 | Bacterial isolation and characterisation

Seawater incubations under laboratory conditions at 25 and 30°C showed turbidity. Therefore, and despite the fact that water was filtrated, possible bacterial growth was assessed. For this purpose, seawater samples (100 μl) from incubations at 25 and 30°C were spread on Marine Agar (MA), *Flexibacter maritimus* medium (FMM) and thiosulfate–citrate-bile salts–sucrose agar (TCBS) and incubated at 25°C. At 48 h, colonies were picked and streaked for pure culture isolation. Genomic DNA was extracted from pure cultures using a Nucleospin Tissue ® Kit (Macherey-Nagel, Duren, Germany) following the protocol provided by the company, and subjected to PCR using 16S F/R primers (5′-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′/5′-GGT TACCTTGTTACGACTTT-3′; Lane, 1991), according to the following thermal profile: 94°C, 2 min; 35 × (94°C, 1 min; 56°C, 1 min; 72°C, 1 min) and 72°C, 5 min. The amplified rDNA was sequenced, and similarity with other strains was calculated using BLASTn tools, in the GenBank database.

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

2.5 | Statistical analysis

Statistical tests were performed using GraphPad Prism 8.1. Decay trends were plotted as the mean ± *SD* of the three replicates established per condition, and significant differences on viability between groups were assessed by two-way ANOVA and Tukey's correction. $p < .05$ indicates statistically significative differences.

3 | RESULTS

3.1 | Viability in LS-sea water

The longest survival for all three strains was recorded at 15°C (Figure 1a). Whereas RG/SJ infective particles were recovered up to around 112 dpi, an intermediate survival was observed in the SJ strain (<98 days), and the lowest value was shown by the RG strain (<70 days) (p .02). Both RG/SJ and SJNNV strains showed a similar behaviour ($p > .05$), and viable particles were progressively reduced over time. The titre of both strains decreased to 50% of the initial value (around 10^3 $TCID_{50}$) on day 63. Afterwards, while no SJNNV infective particles were recovered beyond day 91, RG/SJ was still viable until day 112 post-infection (pi) (2.9×10^1 $TCID_{50}$ ml^{-1}). On the contrary, the initial titre of the RGNNV strain was maintained with no significant oscillations until day 49 pi. After 56 dpi, a reduction of around 1.5 logs was observed and then the viral concentration in water decayed abruptly down to 10^2 on day 63 pi, and RGNNV infective particles were no longer detected.

At 20°C (Figure 1b), survival of RGNNV and RG/SJ strains followed a similar trend ($p > .05$) maintaining the initial titre with a slight decrease (RG/SJ: 3×10^4 and RGNNV: 2×10^4 $TCID_{50}$) until days 35 and 42 pi, respectively, although the decay in viability was observed 14 days earlier in the RG/SJ strain than in RGNNV. The SJNNV titre suffered a strong 2-log reduction up to day 21 pi and no infective particles were detected at day 49 pi.

At 25°C (Figure 1c) NNV survival was clearly reduced 1 or 2 weeks, depending on the strain, when compared with 20°C. At 35 dpi, the RGNNV and SJNNV titres dropped below detectable levels. However, minor differences between both strains were observed and whereas the RGNNV titre was maintained stable at high values (10^6 – 3×10^5) for 3 weeks and then a strong reduction of around 3 logs was observed on day 28 pi, the decay in the titre was quicker in SJNNV ($p > .05$). RG/SJ viable particles were progressively reduced until finally halved on day 21 pi and no viable particles were detected at 28 dpi.

Finally, at 30°C RGNNV and SJNNV viability was reduced to 3 weeks (10^2 $TCID_{50}$) (Figure 1d), and RG/SJ survived for only 7 days (2×10^4).

All incubation assays showed bacterial growth from the beginning of the incubation onwards (except for those at 15°C), despite the fact that seawater was filtered prior to the addition of the virus.

3.2 | Reassortant viability in HS water

For comparative purposes, the reassortant RG/SJ strain was also inoculated in HS-seawater. Survival was considerably reduced in

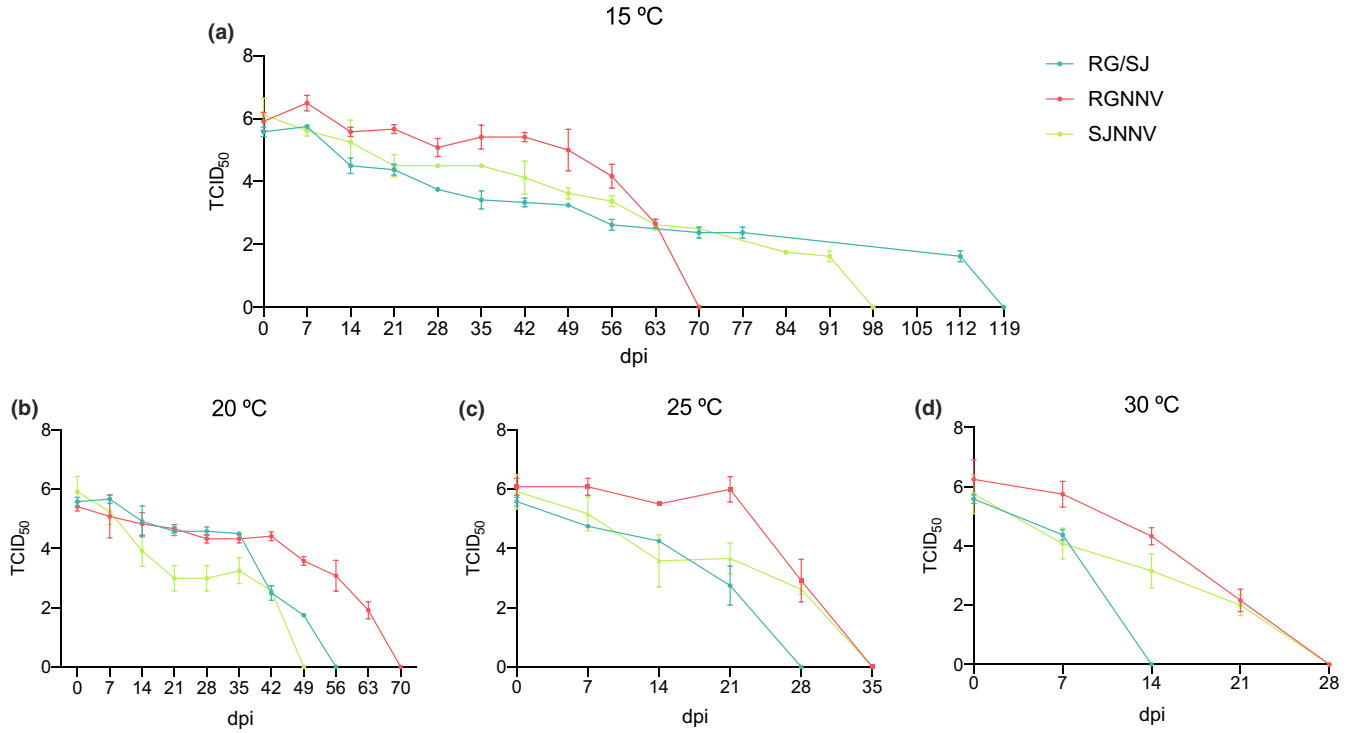


FIGURE 1 Viral decay curves of the three strains (RG/SJ: blue; RGNNV: red; SJNNV: green) at 15 (a), 20 (b), 25 (c), and 30°C (d). Data are represented as the $TCID_{50}$ mean ± *SD* of the three replicates established per condition

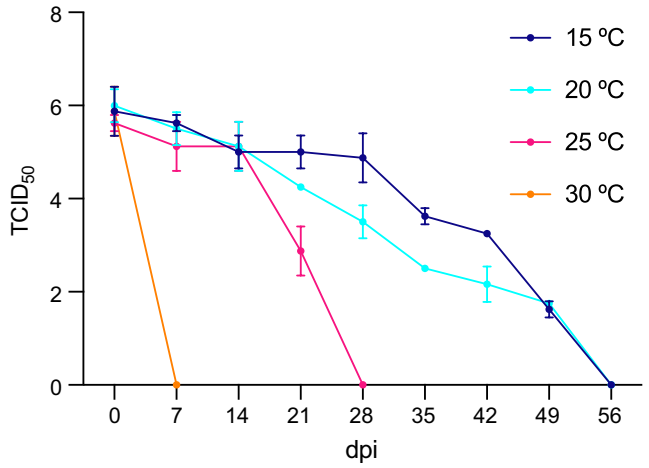


FIGURE 2 Inactivation trend of RG/SJ strain upon incubation in high-salinity (HS) seawater at 15 (dark blue), 20 (light blue), 25 (pink), and 30°C (orange). Curves represent the average $TCID_{50}$ values ± *SD* of the three replicates

the incubation at 15°C (49 dpi) with respect to the LS-seawater (112 dpi) (p .02), while it was similar for both salinities at 20 and 25°C (49 and 21 dpi, respectively) although the shape of the decay curve is somewhat different. In detail (Figure 2), viability at 15°C was maintained for 4 weeks (7×10^4) to then show a progressive decrease to 10^3 on day 42 pi and no infective particles were detected beyond day 49 dpi. At 20°C, viral viability decayed progressively until day 35 pi; on day 49 pi, the titre was around 10^2 $TCID_{50}$ and no reassortant particles were detected afterwards. Viral load in the incubation at 25°C followed the same trend as at 15°C and 20°C, with a ~2-log decrease up to day 21 pi, and no NNV particles being detected later, as observed in the LS experiment. At 30°C, complete NNV inactivation was achieved within less than a week, faster than in the LS experiment. Therefore, to better establish the viability period, a subsequent experiment was performed with daily sampling. Results indicated that viable particles were recovered only up to 48 hpi (24 hpi: 2×10^5; 48 hpi: 10^2 $TCID_{50}$ ml^{-1}).

3.3 | NNV survival under aquarium conditions

RG/SJ strain viability was assessed also under aquarium conditions at 25°C and in the absence of any susceptible host. High viral load (7.81×10^5 $TCID_{50}$) was detected after a 1-h incubation, but it decreased 2 and 4 logs at 48 and 72 hpi, respectively (2×10^3 and 3×10^1 $TCID_{50}$) and complete inactivation occurred at day 4 pi.

3.4 | Viability in L-15 culture medium

In L-15 culture medium, the three strains showed the highest viability values at 15°C (Figure 3a). Both RGNNV and RG/SJ showed the greatest survival (up to 140 days) maintaining titres around 2×10^4 and 3×10^4 $TCID_{50}$ ml^{-1}, respectively, although some slight differences were observed between them ($p > .05$). Thus, whereas a

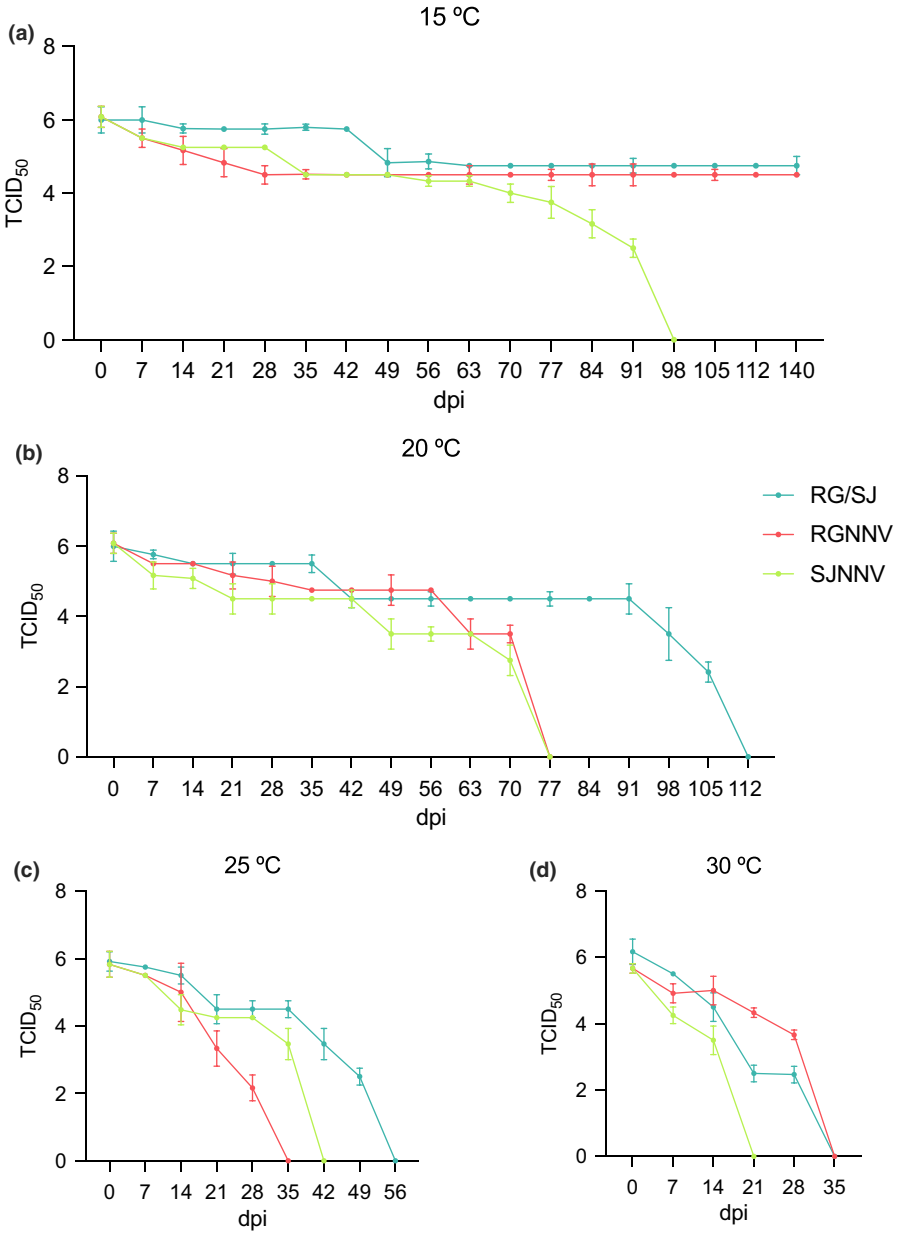


FIGURE 3 Viral load trend (mean $TCID_{50} \pm SD$) of the RG (red), SJ (green), and RG/SJ (blue) strains incubated in triplicate in L-15 culture medium at 15 (a), 20 (b), 25 (c), and 30°C (d)

1-log decline was observed at 49 dpi in the RG/SJ titre, the reduction in RGNNV was observed earlier (21–28 dpi). In addition, a 0.25-log decay occurred on days 84 pi and 105 pi, in the viability of the RGNNV and RG/SJ strains, respectively. As for SJNNV, the initial titre was maintained for 4 weeks and then it was reduced around 1.5-logs on day 35 pi. Viral load halved at day 84 pi and no viral particles were detected at 98 dpi.

At 20°C (Figure 3b), RG/SJ showed the highest survival (up to 105 dpi, 3×10^2) (p .04), and both RGNNV and SJNNV strains were recovered in cell culture up to 70 dpi (3×10^3 and 5×10^2, respectively). The RGNNV titre suffered a strong decline at 63 dpi, whereas the decay in SJNNV was observed earlier (42 dpi). As for RG/SJ, despite showing a slight decline until day 35 pi, viral load remained constant between days 42 and 91 pi. Then, it halved on day 105 pi and no viable particles were detected afterwards.

A clear drop in the viability of all three strains was observed at 25°C, although as occurred at 20°C, the highest survival was shown by the RG/SJ strain (up to 49 dpi). As for RGNNV and SJNNV, viable particles were recovered up to 28 and 35 dpi, respectively (Figure 3c).

Finally, at 30°C (Figure 3d) both RG/SJ and SJNNV strains suffered a striking reduction in viability on days 28 (2×10^2) and 14 pi (5×10^3), respectively, while the RGNNV strain showed a similar decay curve as at 25°C.

3.5 | Quantification of the NNV genomic copies

The number of RNA1 copies detected after a 1-h incubation in all assays was around 3×10^8 ml^{-1}. No significant reduction in NNV

genomic copies was observed throughout the course of the experiments, even when NNV particles became inactivated (Table 2).

3.6 | Bacterial isolation and characterization

Bacterial growth from water samples incubated at 25 and 30°C was only observed in MA. Isolates were identified showing a 100% similarity with genus *Idiomarina*, *Marinobacter*, *Morganella*, *Limnobacter*, and *Salengentibacter*.

4 | DISCUSSION

Spreading through the water column is one of the most important transmission routes for aquatic viruses. However, viral population dynamics in nature are modulated by several factors, including water physicochemical parameters and/or biological load (Oidtmann et al., 2018). Therefore, the aim of this study was to evaluate the NNV survival in different water conditions and compare those results with storage in cell culture medium.

NNV replication is a temperature-sensitive process regulated mainly by RNA1 (Hata et al., 2010; Panzarin et al., 2014; Souto et al., 2019). Optimal temperatures for the in vitro growth of the genotypes found in Southern Europe range from 20 to 30°C (Iwamoto et al., 2000; Panzarin et al., 2014), which also seem to correlate with the onset of epizootic outbreaks. Interestingly, all three strains analysed in this work displayed the greatest viability in seawater at 15°C (RG: 63 dpi, SJ: 91 dpi, RG/SJ: 112 dpi) and viral persistence dropped as temperature increased. This finding suggests a high potential for the dissemination of infective particles through the water environment over long periods, before the summer increase in temperatures favours the onset of VER outbreaks.

At 20°C, the viability of SJNNV and RG/SJ was considerably reduced and only the RGNNV inactivation pattern was similar to 15°C, whereas at 25 and 30°C, a striking drop in viability was observed in all three strains. At 30°C, although RGNNV and SJNNV strains persisted for around 21 days, the drop in viability occurred earlier in the latter (RG: 5×10^5 – 2×10^4 and SJ: 10^4 – 2×10^3, at 7 and 14 dpi, respectively). The maintenance of high RGNNV concentrations in the water may facilitate its transmission and would explain the fact that the vast majority of the NNV outbreaks worldwide (~90%), especially during periods of warm temperatures, are provoked by this genotype (Bandín & Souto, 2020). The overall results indicate an inverse correlation between NNV persistence and water temperature increase (only obvious above 20°C for the RGNNV strain), which is a common feature of many fish viruses (Oidtmann et al., 2018), except for LCDV, in which higher viability values were observed at 22°C than at 18°C (Leiva-Rebollo et al., 2020).

Another factor that could affect the NNV survival in seawater is the presence of microbiota, especially bacterial populations with antiviral activity (Kamei et al., 1988; Shimizu et al., 2006; Teng et al., 2020; Yoshimizu et al., 1986). In this study, incubations were not supplemented with antibiotics in order to avoid new variables in the experiments, so to prevent microbiological contamination, seawater was filtered by 0.2 μm prior to the viral inoculation. However, bacterial growth was observed in all incubations performed above 20°C, leading to the identification of five genera. Although antiviral activity has not been demonstrated in these genera, other marine bacteria such as *Vibrio*, *Aeromonas*, *Achromobacter*, and *Pseudomonas* have been reported to show virucidal or inhibitory activity against different viruses, such as IHNV, IPNV, and Koi herpes virus (KHV) (Garver et al., 2013; Kamei et al., 1988; Oidtmann et al., 2018; Shimizu et al., 2006; Toranzo et al., 1983). Therefore, further studies will be needed to clarify if the bacterial growth was involved in the decrease of NNV viability.

TABLE 2 Range of viral load (number of RNA1 copies ml^{-1}) of the 3 NNV strains at the beginning of the experiment (a) and when NNV particles became inactivated (b). Values represent the mean of the three replicates per assay

	RGNNV/SJNNV	RGNNV	SJNNV
NNV copy number in low salinity seawater (LS)			
15°C	2.7×10^{8a}–6.9×10^{7b}	7.3×10^7–8.8×10^7	5.3×10^8–7.6×10^8
20°C	9.6×10^7–1.7×10^8	4.4×10^8–4.7×10^8	7.6×10^7–1.0×10^8
25°C	9.8×10^7–2.5×10^8	9.6×10^7–9.7×10^7	3.6×10^8–1.9×10^8
30°C	3.6×10^8–9.7×10^7	8.4×10^7–6.7×10^7	3.3×10^8–7.9×10^7
NNV copy number in high-salinity seawater (HS)			
15°C	4.2×10^8–1.1×10^8		
20°C	5.6×10^8–9.7×10^7		
25°C	4.3×10^8–3.7×10^8		
30°C	7.8×10^7–8.2×10^7		
NNV copy number in cell culture medium L-15			
15°C	3.9×10^8–3.3×10^8	8.9×10^7–9.0×10^7	3.9×10^8–3.0×10^8
20°C	4.6×10^8–2.9×10^8	3.1×10^8–3.3×10^8	3.3×10^8–1.6×10^8
25°C	3.3×10^8–7.9×10^7	4.6×10^8–8.7×10^7	1.9×10^8–6.3×10^7
30°C	9.2×10^7–1.2×10^8	1.9×10^8–6.7×10^7	1.1×10^8–7.7×10^7

Salinity is an important factor modulating viral survival (Pinon & Vialette, 2019). Previous studies reported a correlation between IHNV and IPNV inactivation at 15°C with increasing water salinity (Barja et al., 1983), therefore, we also evaluated the survival of the RG/SJ strain in seawater with high salinity (HS) and the results were compared with the incubation in low-salinity water (LS). At 15°C, viral inactivation was accelerated in the HS-seawater (persistence up to 49 d versus 112 in the LS experiment) suggesting that the spreading of NNV in the water environment at this temperature could be compromised. These results contrast with the findings of Frerichs et al. (2000) who detected NNV infective particles after a 6-month incubation in artificial seawater with a 37 g L^{-1} salinity. However, the conditions of both experimental assays, natural (but filtered) seawater in this study versus artificial seawater (Frerichs et al., 2000), may account for the differences in NNV persistence, because viral particles tend to bind to suspended particulate matter leading to an accelerated drop in measurable virus in the water (Oidtmann et al., 2018).

A drop in survival was also observed at 30°C (2 days versus more than 7 days). However, no effect of salinity was observed at 20 and 25°C, which is the range of temperatures at which most of VER outbreaks are reported. The decrease in the NNV titre in the HS group could be due to salt-induced aggregation of viral particles, as occurred in NNV suspensions incubated at different salt concentrations (Gye & Nishizawa, 2016). The reason why this effect is only noticeable at 15 and 30°C certainly deserves further investigation.

Viability at aquarium facilities was also assessed to better resemble farm conditions. In contrast to the laboratory tests, that were conducted in closed systems, assays in the aquarium facilities were performed under open air conditions, allowing the contents to be exposed to UV radiation and oxygen, two well-known factors accounting for viral inactivation (Oidtmann et al., 2018; Rule Wigginton et al., 2010). At 25°C, NNV persistence in the laboratory assays lasted for around 1 month, whereas in aquarium tanks, in the absence of fish, viral inactivation occurred in 4 days. Therefore, our results confirm that both light and oxygen exposure have a negative impact on NNV stability, although the contribution of each of them and the mechanisms involved in viral inactivation should be elucidated. It can also be concluded that in the absence of shedder fish or susceptible individuals, NNV persistence in the aquarium or farm conditions is very limited.

Viral survival in culture medium has been demonstrated to be higher than in seawater because the composition of the medium, mainly inorganic salts, amino acids, and vitamins dissolved in ultrapure water, prevents the aggregation of viral particles and the effect of undesired enzymes (RNases, DNases and proteases) that could act against the capsid protein and/or the viral genome (Jarungsriapisit et al., 2020). In fact, NNV survival in deionized water was shown to be superior to untreated water because the aggregation of viral particles is minimized (Gye & Nishizawa, 2016, 2019). These authors also reported that the presence of FBS could help the stabilization of the capsid protrusions and therefore increase the viral survival. Our results confirm that NNV survival in L-15 is higher than in sea water, although the culture medium was not supplemented with FBS. The viability observed at 25°C supports a previous study that reported complete NNV inactivation between 1 and 3 months (Frerichs et al., 2000). These authors also observed that a 1-year incubation at 15°C in culture medium did not provoke a reduction in the NNV titre. Despite our experiments finishing on day 140 (around 4 and a half months), the viability of the RG and RG/SJ strains at 15°C was barely reduced, suggesting a long viral survival, possibly similar to that reported by Frerichs et al. (2000). However, for some unknown reason, SJ inactivation was drastically accelerated at around 3 months.

Finally, RNA susceptibility to degradation under any minor adverse conditions is well known. However, the drop in viability recorded in almost all the experimental conditions was not correlated with a reduction in the number of RNA1 copies, even when the virus became completely inactivated. Therefore, it may be assumed that the viral genome is not released from the virion into the water environment, preventing the action of undesired RNases naturally contained in seawater (Tsai et al., 1995).

To conclude, we have demonstrated the highest viability of NNV in seawater at 15°C, highlighting the great potential to spread in the water column during long periods. However, the results obtained under aquarium conditions suggest that UV radiation and dissolved oxygen could reduce viral persistence on fish farms and in the marine environment in a short period of time, especially in the absence of susceptible or shedder fish. Additionally, seawater with high salt concentration can shorten NNV survival in areas at both low (15°C) and high (30°C) temperatures. The overall results provide useful knowledge about NNV outbreaks in the wild which may be related to changes in water temperature and/or salinity as a result of climate change. Moreover, the aquaculture industry may also benefit from this study, developing prevention strategies based on the NNV viability values shown here.

ACKNOWLEDGEMENTS

L. Vázquez-Salgado would like to thank the Interreg VA Spain–Portugal cooperation program (POCTEP) 2014-2020, 0474_BLUEBIOLAB project (co-funded by FEDER) for her research contract. The authors would also like to thank Gabriel Arcos Vilanova's contribution with the bacterial isolation and characterization, and Native English School of Languages for the English revision.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

ORCID

Lucia Vázquez-Salgado https://orcid.org/0000-0002-0059-7279
Isabel Bandín https://orcid.org/0000-0002-1947-5933

REFERENCES

Bandín, I., & Souto, S. (2020). Betanodavirus and VER disease: A 30-year research review. *Pathogens*, *9*(2), 106. https://doi.org/10.3390/pathogens9020106

Barja, J. L., Toranzo, A. E., Lemos, M. L., & Hetrick, F. M. (1983). Influence of water temperature and salinity on the survival of IPN and IHN viruses. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, *3*(4), 47–50.

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*(1–2), 13–24. https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00337-3

Garver, K. A., Mahony, A. A. M., Stucchi, D., Richard, J., Van Woensel, C., & Foreman, M. (2013). Estimation of parameters influencing waterborne transmission of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) in atlantic salmon (*Salmo salar*). *PLoS One*, *8*(12), e82296. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082296

Gye, H. J., & Nishizawa, T. (2016). Dialysis buffer with different ionic strength affects the antigenicity of cultured nervous necrosis virus (NNV) suspensions. *Virus Research*, *223*, 108–114. https://doi.org/10.1016/j.virusres.2016.07.002

Gye, H. J., & Nishizawa, T. (2019). Altered conformational structures of nervous necrosis virus surface protrusions and free coat proteins after incubation at moderate-low temperatures. *Scientific Reports*, *9*(1), 1–10. https://doi.org/10.1038/s41598-019-45094-2

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. https://doi.org/10.1007/s00705-010-0736-7

Iwamoto, T., Nakai, T., Mori, K., Arimoto, M., & Furusawa, I. (2000). Cloning of the fish cell line SSN-1 for piscine nodaviruses. *Diseases of Aquatic Organisms*, *43*(2), 81–89. https://doi.org/10.3354/dao043081

Jarungsriapisit, J., Nuñez-Ortiz, N., Nordbø, J., Moore, L. J., Mæhle, S., & Patel, S. (2020). The effect of temperature on the survival of salmonid alphavirus analysed using in vitro and in vivo methods. *Aquaculture*, *516*, 734647. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734647

Kamei, Y., Yoshimizu, M., Ezura, Y., & Kimura, T. (1988). Screening of bacteria with antiviral activity from fresh water salmonid hatcheries. *Microbiology and Immunology*, *32*(1), 67–73. https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.1988.tb01366.x

Lane, D. J. (1991). 16S/23S rRNA Sequencing. In E. Stackebrandt, & M. Goodfellow (Eds.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematic* (pp. 115–175). John Wiley and Sons.

Leiva-Rebollo, R., Labella, A. M., Valverde, E. J., Castro, D., & Borrego, J. J. (2020). Persistence of lymphocystis disease virus (LCDV) in seawater. *Food and Environmental Virology*, *12*, 174–179. https://doi.org/10.1007/s12560-020-09420-6

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. https://doi.org/10.1128/aem.63.4.1633-1636.1997

Oidtmann, B., Dixon, P., Way, K., Joiner, C., & Bayley, A. E. (2018). Risk of waterborne virus spread – review of survival of relevant fish and crustacean viruses in the aquatic environment and implications for control measures. *Reviews in Aquaculture*, *10*(3), 641–669. https://doi.org/10.1111/raq.12192

Olveira, J. G., Souto, S., Dopazo, C. P., & Bandín, I. (2013). Isolation of betanodavirus from farmed turbot *Psetta maxima* showing no signs of viral encephalopathy and retinopathy. *Aquaculture*, *406–407*, 125–130. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.05.007

Olveira, J. G., Souto, S., Dopazo, C. P., Thiéry, R., Barja, J. L., & Bandín, I. (2009). Comparative analysis of both genomic segments of betanodaviruses isolated from epizootic outbreaks in farmed fish species provides evidence for genetic reassortment. *Journal of General Virology*, *90*(12), 2940–2951. https://doi.org/10.1099/vir.0.013912-0

Panzarin, V., Cappellozza, E., Mancin, M., Milani, A., Toffan, A., Terregino, C., & Cattoli, G. (2014). In vitro study of the replication capacity of the RGNNV and the SJNNV betanodavirus genotypes and their natural reassortants in response to temperature. *Veterinary Research*, *45*(1), 1–11. https://doi.org/10.1186/1297-9716-45-56

Panzarin, V., Fusaro, A., Monne, I., Cappellozza, E., Patarnello, P., Bovo, G., Capua, I., Holmes, E. C., & Cattoli, G. (2012). Molecular epidemiology and evolutionary dynamics of betanodavirus in southern Europe. *Infection, Genetics and Evolution*, *12*(1), 63–70. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.10.007

Pinon, A., & Vialette, M. (2019). Survival of viruses in water. *Intervirology*, *61*(5), 214–222. https://doi.org/10.1159/000484899

Reed, L. J., & Muench, H. (1938). A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *The American Journal of Hygiene*, *27*, 493–497.

Rule Wigginton, K., Menin, L., Montoya, J. P., & Kohn, T. (2010). Oxidation of virus proteins during UV254 and singlet oxygen mediated inactivation. *Environmental Science and Technology*, *44*(14), 5437–5443. https://doi.org/10.1021/es100435a

Shimizu, T., Yoshida, N., Kasai, H., & Yoshimizu, M. (2006). Survival of koi herpesvirus (KHV) in environmental water. *Fish Pathology*, *41*(4), 153–157. https://doi.org/10.3147/jsfp.41.153

Souto, S., Olveira, J. G., García-Rosado, E., Dopazo, C. P., & Bandín, I. (2019). Amino acid changes in the capsid protein of a reassortant betanodavirus strain: Effect on viral replication in vitro and in vivo. *Journal of Fish Diseases*, *42*(2), 221–227. https://doi.org/10.1111/jfd.12916

Teng, Y. F., Xu, L., Wei, M. Y., Wang, C. Y., Gu, Y. C., & Shao, C. L. (2020). Recent progresses in marine microbial-derived antiviral natural products. *Archives of Pharmacal Research*, *43*(12), 1215–1229. https://doi.org/10.1007/s12272-020-01286-3

Toffan, A., Pascoli, F., Pretto, T., Panzarin, V., Abbadi, M., Buratin, A., Quartesan, R., Gijon, D., & Padros, F. (2017). Viral nervous necrosis in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) caused by reassortant betanodavirus RGNNV/SJNNV: An emerging threat for Mediterranean aquaculture. *Scientific Reports*, *7*, 1–12. https://doi.org/10.1038/srep46755

Toffolo, V., Negrisolo, E., Maltese, C., Bovo, G., Belvedere, P., Colombo, L., & Dalla Valle, L. (2007). Phylogeny of betanodaviruses and molecular evolution of their RNA polymerase and coat proteins. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *43*(1), 298–308. https://doi.org/10.1016/j.ympev.2006.08.003

Toranzo, A. E., Barja, J. L., Lemos, M. L., & Hetrick, M. (1983). Stability of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in untreated, filtered and autoclaved estuarine water. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, *3*(4), 51–53.

Tsai, Y. L., Tran, B., & Palmer, C. J. (1995). Analysis of viral RNA persistence in seawater by reverse transcriptase- PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, *61*(1), 363–366. https://doi.org/10.1128/aem.61.1.363-366.1995

Yoshimizu, M., Takizawa, H., Kamei, Y., & Kimura, T. (1986). Interaction between fish pathogenic viruses and microorganisms in fish rearing water: survival and inactivation of infectious pancreatic necrosis virus, infectious hematopoietic necrosis virus and *Oncorhynchus masou* virus in rearing water. *Fish Pathology*, *21*(4), 223–231. https://doi.org/10.3147/jsfp.21.223

How to cite this article: Vázquez-Salgado, L., Olveira, J. G., & Bandín, I. (2022). Nervous necrosis virus viability modulation by water salinity and temperature. *Journal of Fish Diseases*, 45, 561–568. https://doi.org/10.1111/jfd.13581

VAZQUEZ SALGADO LUCIA

De: Copyright <Copyright@fao.org>
Enviado el: lunes, 7 de marzo de 2022 12:44
Para: VAZQUEZ SALGADO LUCIA
CC: Copyright
Asunto: Re: PhD Thesis

Dear Lucía,
thank you.

Please note that, according to the FAO Terms & Conditions, FAO public content "*FAO is committed to making its content freely available and encourages the use, reproduction and dissemination of the text, multimedia and data presented....content may be copied, printed and downloaded for private study, research and teaching purposes, and for use in non-commercial products or services, provided that appropriate acknowledgement of FAO as the source and copyright holder is given and that FAO's endorsement of users' views, products or services is not stated or implied in any way...*".

Based on the above and with the understanding that the scope to use the Figures 1 and 8 on FAO publication

https://www.fao.org/3/ca9229en/online/ca9229en.html#chapter-1_1 is for educational purpose, we are pleased to confirm and grant the permission for this request to reproduce/reuse the above-mentioned FAO copyright material at no charge, including the right to publish, reproduce, publicly display and distribute the whole or any part of the material in this and all revisions and any subsequent editions of your work; in any ancillary aids that may be prepared to accompany your work, including promotion and publicity uses; and in all forms of media now known or later developed.

Kindly note the following:

- FAO remains the copyright holder of the material, and retains the right to reproduce, translate, publish, and disseminate the whole or any part of it in print and electronic formats, and to grant others the right to do the same, as well as to incorporate material derived from the material in any subsequent work.
- The use of the official emblem or other logos of FAO is prohibited without express and prior written approval by FAO.
- The material must not be used in any way that implies FAO's endorsement of any companies, services or products.

Due acknowledgement shall be made to FAO, with the source document cited and Web URL provided as follows:

Source: Food and Agriculture Organization of the United Nations, [Year of Publication], [Authors], [Title of Publication], [URL]. Reproduced with permission.

Best regards,
Patrizia

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

El Virus de la Necrosis Nerviosa Viral es un importante patógeno de peces, miembro del Género Betanodavirus, y es el agente etiológico de la enfermedad denominada Encefalopatía y Retinopatía Viral que provoca grandes pérdidas en la acuicultura mundial. En esta tesis doctoral se presentan los resultados de un estudio epidemiológico sobre la prevalencia del VNNV en especies capturadas en aguas de la costa Atlántica de Galicia y se demuestra que los invertebrados marinos son una vía de introducción del patógeno en los criaderos. También se analizan diferentes parámetros que pueden afectar a la aparición de epizootias, y que pueden ser la base de nuevas estrategias de control de la infección.