

## **Malattia Proliferativa Renale (MPR): due anni di ricerche in Italia**

### *Proliferative Kidney Disease (PKD): a two years survey in Italy*

**Andrea Gustinelli<sup>1</sup>, Monica Caffara<sup>1</sup>, Rinaldo Brunetti<sup>2</sup>,  
Fabio Borghesan<sup>3</sup>, Amedeo Manfrin<sup>3</sup>, Maria Illuminata Taticchi<sup>4</sup>,  
Maria Letizia Fioravanti<sup>1</sup>, Marino Prearo<sup>2\*</sup>**

<sup>1</sup> Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale, Università di Bologna

<sup>2</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, della Liguria e della Valle d'Aosta, Torino

<sup>3</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro (PD)

<sup>4</sup> Dipartimento di Biologia Animale ed Ecologia, Università di Perugia

---

RIASSUNTO - Nell'ambito di progetti di ricerca finanziati dal Ministero della Salute e dal Ministero delle Politiche Agricole e Forestali, dal 2002 al 2004 sono state condotte indagini sulla diffusione di *Tetracapsuloides bryosalmonae* (Myxozoa, Saccosporidae) in Italia settentrionale. Sono state esaminate in totale 2065 trote iridee (*Oncorhynchus mykiss*) prelevate presso 46 allevamenti intensivi. La ricerca del parassita veniva condotta mediante PCR su pool di porzioni di rene posteriore ottenuti da 10-15 soggetti/allevamento. Ventisei (56,5%) dei 46 allevamenti considerati sono risultati positivi per *T. bryosalmonae*. Negli allevamenti positivi la presenza del parassita è stata rilevata quasi sempre a partire dal mese di maggio, con emergenza della malattia a temperature superiori a 15° C (giugno-settembre) ad eccezione di un allevamento in cui segni clinici riferibili a MPR con mortalità elevata sono stati osservati per tutto il periodo invernale a temperature inferiori a 12° C. Parallelamente è stata effettuata la ricerca del parassita nei briozoi, considerati gli ospiti naturali di *T. bryosalmonae*, in tutti i corsi d'acqua di alimentazione degli allevamenti considerati. Complessivamente sono stati presi in esame 32 corsi d'acqua compresi in 14 bacini idrografici del versante settentrionale del fiume Po. I briozoi raccolti sono stati sottoposti ad esame microscopico a fresco, quindi fissati in alcool 70° per l'identificazione di specie e per la conduzione della PCR. Tutti i briozoi esaminati sono risultati negativi per *T. bryosalmonae*. Sono state identificate 12 differenti specie di briozoi appartenenti ai generi *Plumatella*, *Cristatella*, *Fredericella* e *Paludicella*. Le ricerche future dovranno meglio definire il ruolo dei briozoi quali ospiti naturali di *T. bryosalmonae* in Italia e chiarire la reale influenza della temperatura sull'insorgenza della MPR nell'ospite pesce.

*SUMMARY – In the framework of two research projects granted by Ministry of Health and Ministry of Agriculture, from 2002 to 2004 a survey of the diffusion of Tetracapsuloides bryosalmonae (Myxozoa, Saccosporidae) in Northern Italy has been carried out. Two thousands sixty five rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) sampled from 46 intensive farms were examined. Detection of the parasite has been conducted by PCR on pools of the posterior kidney from 10-15 trouts/farm. Twenty-six (56.5%) out of 46 farms were positive for T. bryosalmonae. In the infected farms the presence of the parasite was detected since May, while clinical signs appeared with water temperature over 15° C (from June to September), except for one farm where symptoms of PKD and high mortality occurred along all winter season, at temperature lower than 12° C. At the same time a survey of the parasite in bryozoans, natural hosts of T. bryosalmonae, has been carried out in all the water courses inflowing the farms. We investigated 32 rivers included in 14 different catchment basins located in the north side of Po river. Bryozoans were examined microscopically, then fixed in 70° ethanol in order to identify the species and conduct PCR. All the bryozoans were negative for T. bryosalmonae. Twelve species of bryozoans were identified, belonging to genera Plumatella, Cristatella, Fredericella and Paludicella. Further studies will be necessary to establish the role of bryozoans as natural hosts of T. bryosalmonae in Italy and define the actual influence of the temperature on clinical manifestation of PKD in the fish host.*

**Key words:** *Tetracapsuloides bryosalmonae*, Proliferative Kidney Disease, PKD, Rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, Bryozoa, Italy

---

\* Corresponding Author: c/o Area Territoriale Piemonte, Sezione di Torino, Ittiopatologia e Acquacoltura, Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Via Bologna, 148 - 10154 Torino. Tel.: 011-2686251; Fax: 011-2474458; E-mail: marino.prearo@izsto.it

## INTRODUZIONE

La Malattia Proliferativa Renale, più comunemente conosciuta come PKD (Proliferative Kidney Disease), rappresenta in Italia ed in tutta Europa una delle malattie parassitarie più importanti in trotticoltura intensiva.

Colpisce tutte le specie appartenenti alla famiglia Salmonidae, anche se nel continente europeo la trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*), la trota fario (*Salmo trutta fario*) ed il salmerino di fonte (*Salvelinus fontinalis*) si sono dimostrate maggiormente sensibili. Sono stati inoltre segnalati rari episodi di PKD nel luccio (*Esox lucius*) (Hedrick *et al.*, 1993).

La PKD è una malattia a decorso tendenzialmente cronico che si manifesta prevalentemente durante i mesi estivi a temperature dell'acqua superiori a 15° C (Hedrick *et al.*, 1993). L'infezione sembra essere comunque in grado di permanere in modo sub-clinico o latente durante tutto l'anno (Gay *et al.*, 2001).

I segni clinici sono in genere aspecifici, con ipermelanosi cutanea, anoressia ed esoftalmo bilaterale, o scarsamente indicativi con anemia branchiale ed accentuata distensione addominale (Hedrick *et al.*, 1993); la frequente sovrapposizione di altre patologie complica ulteriormente la conduzione di una diagnosi su base esclusivamente clinica.

All'esame necroscopico è possibile emettere una diagnosi presuntiva qualora si osservino lesioni tipiche della malattia come l'abnorme ingrossamento del rene medio-posteriore e la splenomegalia. La conferma diagnostica è comunque sempre legata all'evidenziazione dell'agente eziologico mediante esame microscopico di impronte di rene e milza colorate con May-Grünwald-Giemsa (Klontz & Chako, 1983; Hedrick *et al.*, 1986), esami istologici ed immunoistochimici mediante lectine (Castagnaro *et al.*, 1991; Marin de Mateo *et al.*, 1991) o anticorpi monoclonali (Marin de Mateo *et al.*, 1993; Morris *et al.*, 1997) e tecniche biomolecolari, quali ibridazione *in situ* (Antonio *et al.*, 1998) e PCR (Polymerase Chain Reaction) (Kent *et al.*, 1998).

L'agente eziologico di questa patologia, descritta da oltre ottanta anni in Europa (Plehn, 1924) e da oltre venti anni in America Settentrionale (Smith *et al.*, 1982), è rimasto per lungo tempo sconosciuto, finché nel 1999 è stato collocato definitivamente da Saulnier *et al.* all'interno del phylum Myxozoa e denominato *Tetracapsula bryosalmonae* da Canning *et al.* (1999). Nel 2000 Canning *et al.* crearono la nuova classe Malacosporea, differenziandola dalla classe Mixosporea, per comprendere sia questa specie che *T. bryozoides*, quest'ultimo parassita dei Bryozoa.

Recentemente Canning *et al.* (2002) hanno posto *T. bryozoides* in sinonimia con *Buddenbrockia plumatellae* ed hanno ridenominato l'agente eziologico della PKD *Tetracapsuloides bryosalmonae*.

Sebbene i briozoi siano ormai considerati gli ospiti naturali di *T. bryosalmonae*, il ruolo dei salmonidi all'interno del ciclo biologico del parassita è ancora da chiarire. Infatti, mentre la trasmissione del parassita dai briozoi alla trota è stata confermata sperimentalmente (Feist *et al.*, 2001), le ripetute prove di trasmissione effettuate per dimostrare il passaggio dell'infezione dai salmonidi ai briozoi e dai briozoi infetti ad altri briozoi hanno dato finora risultati negativi. Alla luce di queste sperimentazioni si è ipotizzato un ruolo dei salmonidi quali ospiti accidentali a fondo cieco di *T. bryosalmonae*, nel cui ciclo biologico sarebbe coinvolto un ospite alternato/intermedio a tutt'oggi ignoto (Tops *et al.*, 2004).

Nell'ambito di progetti di ricerca biennali intrapresi nel 2002 grazie a finanziamenti ottenuti dal Ministero della Salute e dal Ministero delle Politiche Agricole e Forestali, sono state realizzate indagini volte a determinare la diffusione della PKD in trotticoltura intensive nazionali, dedicando particolare attenzione alle regioni dell'Italia settentrionale dove la malattia è storicamente endemica. In parallelo, alla luce della carenza di informazioni scientifiche a riguardo, sono state condotte ricerche sulla diffusione dei briozoi nei corsi

d'acqua connessi alle trote coltivate prese in considerazione, procedendo alla loro identificazione di specie ed alla ricerca di *T. bryosalmonae*.

## MATERIALI E METODI

Da aprile 2002 sono stati effettuati campionamenti di trote iridee (*Oncorhynchus mykiss*) in 46 allevamenti intensivi situati nel versante settentrionale del bacino del fiume Po, nel territorio delimitato dal fiume Ticino ad ovest e dai bacini idrografici Stella-Corno-Ausa ad est. In particolare sono stati presi in considerazione 3 allevamenti in Piemonte e Lombardia, 6 in Trentino Alto-Adige, 19 in Veneto e 15 in Friuli Venezia-Giulia. Sono state campionate in totale 2065 trote iridee.

Ogni campionamento consisteva di 10/15 soggetti da cui venivano prelevate porzioni di rene posteriore, organo d'elezione per *T. bryosalmonae*, successivamente fissate in alcool 70° ed omogenate ad ottenere un unico pool.

Su 25 mg dell'omogenato veniva condotta PCR previa estrazione del DNA secondo il protocollo "DNeasy Tissue Kit" (Qiagen, Valencia, CA). La PCR è stata condotta su 50 µl di reazione utilizzando 1,25U di *Taq* DNA polymerase - Qiagen, Valencia, CA.

L'amplificazione del DNA è stata condotta con il termociclatore Tpersonal (Biometra, Germania) con il seguente ciclo: 1 min. a 95° C, 1 min. a 52° C, 1 min. a 72° C per 30 cicli, preceduti da 5 min. di denaturazione a 95° C e seguiti da estensione di 5 min a 72° C. Il prodotto di PCR è stato sottoposto a corsa elettroforetica in gel d'agarosio al 2% in TAE buffer ed analizzato con FluorS multImager (Bio-Rad, Hercules, CA). I primers utilizzati (pkd3f: GAGTAGGAGACCGAAATGGACG; pkd6r: GGACCTTACTCGTTTCCGACC), permettono l'amplificazione un frammento di 436bp.

Parallelamente ai campionamenti di trote sono state condotte ricerche sulle popolazioni di briozoi presenti nei corsi d'acqua strettamente connessi agli impianti monitorati. La ricerca è stata svolta su 32 fiumi compresi in 13 diversi bacini idrografici, tutti situati sul versante settentrionale del fiume Po e qui di seguito elencati: Stella, Corno, Ausa, Tagliamento, Livenza, Piave, Sile, Brenta, Adige, Sarca, Mincio, Oglio, Ticino.

Le colonie di briozoi venivano raccolte manualmente da substrati sommersi, mantenute in appositi contenitori in acqua di provenienza e, una volta giunti in laboratorio e verificatane la vitalità, stabulate in acqua deionizzata a temperatura ambiente per circa 15 giorni. In questo periodo venivano sottoposte ad osservazione microscopica al fine di individuare l'eventuale presenza di *T. bryosalmonae*.

Tutte le colonie venivano quindi fissate in alcool 70° e sottoposte al processo di estrazione del DNA secondo il protocollo indicato da Gay *et al.* (2001). La PCR è stata condotta con la stessa metodica utilizzata per i reni di trota.

Per quanto concerne le colonie ed i polipidi, l'identificazione di specie è stata svolta su base morfologica sia su preparati a fresco che su materiale fissato in alcool 70°, mentre gli statoblasti sono stati sottoposti ad identificazione mediante osservazione al Microscopio Elettronico a Scansione (SEM).

## RISULTATI

Dei 46 allevamenti esaminati, 26 (56,5%) sono risultati positivi per PKD. In particolare, oltre il 60% degli allevamenti siti in Piemonte, Lombardia, Veneto e Friuli Venezia-Giulia sono risultati positivi, mentre tutte le trote coltivate del Trentino Alto-Adige sono risultate

negative. In figura 1 sono indicati gli allevamenti risultati positivi per *T. bryosalmonae* sul totale degli esaminati.

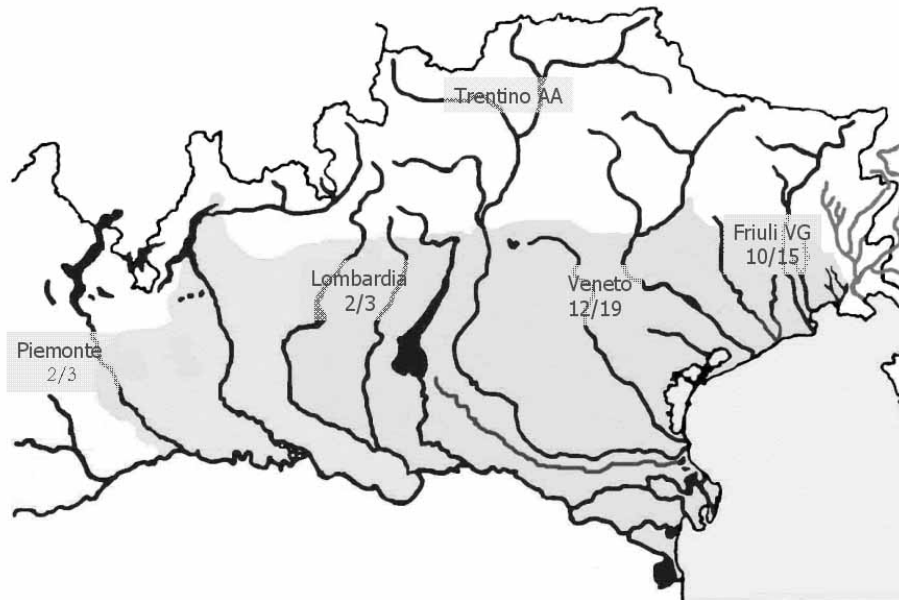


Figura 1 - Numero di allevamenti positivi per *Tetracapsuloides bryosalmonae* sul totale degli esaminati  
 Figure 1- Number of trout farms positive for *Tetracapsuloides bryosalmonae* out of the examined farms

Con rare eccezioni, le positività per *T. bryosalmonae* sono state evidenziate a partire dal mese di maggio, con emergenza clinica della malattia nel periodo giugno-settembre, quando la temperatura dell'acqua superava i 15° C.

Va posto in evidenza un interessante episodio di PKD sintomatica manifestatosi con mortalità piuttosto elevata (secondo l'allevatore circa il 20% della popolazione in vasca) nel corso di tutto il periodo invernale a temperature al di sotto di 12° C. Le trote in questo caso erano state immesse in allevamento in autunno avanzato e provenivano da un impianto indenne da PKD.

E' stato inoltre possibile osservare l'insorgenza della malattia anche in trotelle allevate in una trocicoltura alimentata esclusivamente con acqua di pozzo. Gli avannotti erano stati acquistati presso un'avannotteria il cui stato sanitario in riferimento alla PKD non era conosciuto e cominciarono a manifestare moderati sintomi di malattia, con mortalità a stitlicidio, circa un mese dopo l'arrivo con temperature dell'acqua mediamente intorno a 12,5° C.

Le ricerche condotte sui briozoi hanno permesso di individuare 12 diverse specie di briozoi appartenenti ai generi *Plumatella*, *Cristatella*, *Paludicella* e *Fredericella* (vedi Tabella 1), raccolte in 8 dei 14 bacini idrografici esaminati. Nei rimanenti sei non è stato possibile reperire colonie né statoblasti di briozoi. Nella Tavola 1 sono riportate alcune immagini

raffiguranti colonie di briozoi reperite su diversi tipi di substrati sommersi nel corso dell'indagine.

SPECIE	AUSA	SILE	MINCIO	OGLIO	ADIGE	PIAVE	TICINO
<i>Plumatella fungosa</i>		×					
<i>Plumatella rugosa</i>		×	×				
<i>Plumatella similrepens</i>		×		×			
<i>Plumatella emarginata</i>		×		×			
<i>Plumatella reticulata</i>		×	×	×			
<i>Plumatella casmiana</i>		×					
<i>Plumatella fruticosa</i>				×		×	
<i>Plumatella</i> sp.		×	×	×		×	
<i>Plumatella repens</i>		×					
<i>Cristatella mucedo</i>		×					
<i>Paludicella articulata</i>		×					
<i>Fredericella sultana</i>	×	×	×	×	×	×	×

Tabella 1 - Specie di briozoi individuate in 7 dei 13 bacini idrografici presi in considerazione  
 Table 1 - Bryozoan species recovered from 7 out of the 13 catchment basins considered

Tutte le colonie e gli statoblasti di briozoi esaminati sono risultati negativi per *T. bryosalmonae* sia all'esame microscopico a fresco che alla PCR.

Unico reperto di un certo rilievo nei briozoi esaminati appare il ritrovamento, in alcuni flottoblasti di *Plumatella fungosa* raccolti nel mese di luglio, di strutture vermiformi mobili lunghe 0,5-8 mm morfologicamente riferibili a stadi di sviluppo di Myxozoa.

## DISCUSSIONE

In base ai risultati di questa indagine, la diffusione di *Tetracapsuloides bryosalmonae* nelle trottocolture dell'Italia settentrionale appare in linea di massima sovrapponibile a quella già delineata in passato da altri autori (Ghittino *et al.*, 1995; Prearo, 2000), con oltre il 50% di allevamenti positivi nelle regioni del versante settentrionale del fiume Po, fatta eccezione per il Trentino Alto-Adige.

Benché la prevalenza dell'infezione sembri essere rimasta costante nell'arco degli ultimi decenni, va evidenziato come il "problema PKD" sia in questi ultimi anni meno sentito dagli allevatori, forse anche in relazione alla maggiore attenzione rivolta a patologie di recente emergenza che compaiono anch'esse nel periodo estivo e determinano perdite molto più ingenti, come ad esempio la Lattococcosi da *Lactococcus garvieae*.

In riferimento alla minore importanza data alla PKD da parte degli allevatori, va senz'altro considerata fondamentale anche la crescente applicazione di misure di profilassi che si basano essenzialmente sulla esposizione controllata dei pesci a *T. bryosalmonae* in tarda estate, quando la carica infettante è in diminuzione e la temperatura dell'acqua non consente l'esplosione della malattia, ma è sufficiente allo sviluppo di una immunocompetenza duratura.

L'episodio di PKD conclamata osservato in un allevamento durante il periodo invernale a temperature dell'acqua inferiori a 12° C pone comunque seri interrogativi sull'importanza



Tavola I – A) boa con colonie di *Plumatella fungosa* e *P. rugosa* sulla parte sommersa; B) particolare della precedente; C) tegola con colonie di *Fredericella sultana* adese alla superficie inferiore; D e E) colonie di *F. sultana* su oggetti sommersi; F) zooidi di *Plumatella* sp.: osservazione allo stereomicroscopio.

Plate I - A) buoy covered with colonies of *Plumatella fungosa* and *P. rugosa* on the submerged side; B) particular of the previous figure; C) tile with colonies of *Fredericella sultana* on the inferior side; D & E) colonies of *F. sultana* on submerged objects; F) zooids of *Plumatella* sp. at the dissection microscope.

della temperatura quale fattore scatenante la malattia. Se infatti in generale la temperatura sembra in grado di influenzare l'abnorme risposta infiammatoria caratteristica della PKD, risultando un fattore patogenetico determinante (Hedrick *et al.*, 1993), si può ipotizzare che infezioni massive da *T. bryosalmonae* possano determinare l'insorgenza della patologia anche in assenza di temperature idonee. Ciò potrebbe realizzarsi quando gli ospiti naturali del parassita risultano essere presenti durante tutto il corso dell'anno, come già dimostrato per *Fredericella sultana* (Gay *et al.*, 2001), unica specie di briozoi reperita a monte dell'allevamento in causa.

Va comunque specificato che tutti gli esami effettuati sulle colonie di *F. sultana* provenienti dalla zona, peraltro reperite sempre in quantità esigua, hanno finora dato esito negativo.

Interessante è parso anche il riscontro di positività per *T. bryosalmonae*, in presenza di sintomi blandi di malattia, in trotelle stabulate in vasche alimentate con acqua di pozzo e che senz'altro avevano acquisito l'infezione nell'avannotteria di provenienza. Ciò sembra suggerire la necessità di includere in futuro anche le avannotterie nel monitoraggio della PKD in Italia, e di approfondire in questa direzione l'anamnesi di episodi di malattia di difficile interpretazione.

Per quanto riguarda l'individuazione degli ospiti naturali di *T. bryosalmonae* sul territorio nazionale, il mancato rilevamento del parassita nei numerosi briozoi campionati nel corso di questa indagine pone seri interrogativi sull'epidemiologia della parassitosi in Italia.

La ricerca ha comunque permesso di delineare una notevole diffusione di briozoi, con un'ampia gamma di specie, nei bacini idrografici da noi esaminati ed ha contribuito a definire la distribuzione di questi invertebrati sessili negli ambienti dulciacquicoli nazionali.

Va evidenziato l'interessante ritrovamento di alcune strutture vermiformi mobili simili a quelle di *Buddenbrockia plumatellae* all'interno di statoblasti della specie *Plumatella fungosa*, reperto che andrà approfondito in relazione alla loro possibile identità come stadi vermiformi di *T. bryosalmonae* (Taticchi *et al.*, 2004).

Il mancato reperimento di *T. bryosalmonae* in tutti i briozoi da noi esaminati, unitamente all'esiguità o all'incostanza dell'infezione rilevata da autori stranieri in popolazioni naturali di briozoi (Okamura *et al.*, 2001; Okamura & Wood, 2002) pone alcuni interrogativi sul ruolo di questi organismi quali unici ospiti naturali/serbatoi dell'infezione.

Una maggiore comprensione dell'epidemiologia di *T. bryosalmonae* sia in ambiente naturale che in allevamento, con l'individuazione degli ospiti naturali e la definizione dei fattori condizionanti la trasmissione dell'infezione e l'insorgenza della PKD, consentirà di delineare in modo sempre più adeguato le strategie di prevenzione e controllo di questa importante patologia parassitaria.

## RINGRAZIAMENTI

Ricerche condotte con finanziamenti del Ministero della Salute e del Ministero delle Politiche Agricole e Forestali.

Si ringraziano per la disponibilità e la collaborazione dimostrate tutti gli allevatori ed i colleghi che hanno contribuito alla realizzazione della ricerca.

## BIBLIOGRAFIA

Antonio D.B., Andree K.B., McDowell T.S. & Hedrick R.P. (1998). Detection of *Myxobolus cerebralis* in rainbow trout and oligochaete tissues by using a nonradioactive in situ hybridization (ISH) protocol. *J. Aquat. An. Health*, 10: 338-347.

- Canning E.U., Curry A., Feist S.W., Longshaw M. & Okamura B. (1999). *Tetracapsula bryosalmonae* n. sp. for PKX organism, the cause of PKD in salmonid fish. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 19: 203-206.
- Canning E.U., Curry A., Feist S.W., Longshaw M. & Okamura B. (2000). A new Class and Order of Myxozoans to accommodate parasites of Bryozoans with ultrastructural observations on *Tetracapsula bryosalmonae* (PKX organism). *J. Eukariot. Microbiol.*, 47, 5: 456-468.
- Canning E.U., Tops S., Curry A., Wood T.S. & Okamura B. (2002). Ecology, development and pathogenicity of *Buddenbrockia plumatellae* Schröder, 1910 (Myxozoa, Malacosporea) (syn. *Tetracapsula bryozoides*) and establishment of *Tetracapsuloides* n. gen. for *Tetracapsula bryosalmonae*. *J. Eukariot. Microbiol.*, 49: 280-295.
- Castagnaro M., Marin M., Ghittino C. & Hedrick R.P. (1991). Lectin histochemistry and ultrastructure of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* kidneys affected by proliferative kidney disease. *Dis. Aquat. Org.*, 10: 173-183.
- Feist S.W., Longshaw M., Canning E.U. & Okamura B. (2001). Induction of proliferative kidney disease (PKD) in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* via the bryozoan *Fredericella sultana* infected with *Tetracapsula bryosalmonae*. *Dis. Aquat. Org.*, 45: 61-68.
- Gay M., Okamura B. & de Kinkelin P. (2001). Evidence that infectious stages of *Tetracapsula bryosalmonae* for rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* are present throughout the year. *Dis. Aquat. Org.*, 46: 31-40.
- Ghittino C., Prearo M., Bozzetta E., Marin De Mateo M. & Adams A. (1995). Survey on the geographical distribution of PKD in Italy. *VII International Conference E.A.F.P., 10-15 september 1995, Palma de Mallorca, Spain; Abstract Book*: 10.
- Hedrick R.P., Kent M.L. & Smith C.E. (1986). Proliferative Kidney Disease in salmonid fishes. *U.S. Dept. of Interior, Fish and wildlife Service, Fish Dis. Leaflet*, 74: 9.
- Hedrick R.P., Mac Connell E. & de Kinkelin P. (1993). Proliferative Kidney Disease of salmonid fish. *Annual Rev. Fish Dis.*: 277-290.
- Kent M., Khattra J., Hervio D.M.L. & Devlin R.H. (1998). Ribosomal DNA sequence analysis of isolates of PKX myxosporean and their relationship to members of the genus *Sphaerospora*. *J. Aquat. An. Health*, 10: 12-21.
- Klontz G.W. & Chacko A.J. (1983). Methods to detect the organism causing Proliferative Kidney Disease in salmonids. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 3: 33-36.
- Marin de Mateo M., Adams A., Richards R.H, Castagnaro M. & Hedrick R.P. (1993). Monoclonal antibody and lectin probes recognize developmental and sporogonic stages of PKX, the causative agent of Proliferative Kidney Disease in European and North American salmonid fish. *Dis. Aquat. Org.*, 15: 23-29.
- Marin de Mateo M., Ghittino C. & Castagnaro M. (1991). Dimostrazione dell'agente eziologico della PKD nella trota iridea mediante la tecnica istochimica delle lectine: nota preliminare. *Boll. Soc. It. Patol. Ittica*, 5: 62-68.
- Morris D.J., Adams A. & Richards R.H. (1997). Studies of the PKX parasite in rainbow trout via immunoistochemistry and immunogold electron microscopy. *J. Aquat. An. Health*, 9: 265-273.

- Okamura B., Anderson C.L., Longshaw M., Feist S.W. & Canning E.U. (2001). Patterns of occurrence and 18S rDNA sequence variation of PKX (*Tetracapsula bryosalmonae*), the causative agent of salmonid proliferative kidney disease. *J. Parasitol.*, 87, 2: 379-385.
- Okamura B. & Wood T.S. (2002). Bryozoans as hosts for *Tetracapsula bryosalmonae*, the PKX organism. *J. Fish Dis.*, 25: 469-475.
- Plehn M. (1924). Praktikum der Fischkrankheiten. *Schweizerbartesche Stuttgart*: 423-424
- Prearo M. (2000). Epidemiologia della PKD in Italia. *Atti VII Convegno Nazionale Soc. It. Patol. Ittica, Riva del Garda (TN), 28-29 settembre 2000*: 3-4.
- Saulnier D., Philippe H. & de Kinkelin P. (1999). Molecular evidence that the proliferative kidney disease organism unknown (PKX) is a myxosporean. *Dis. Aquat. Org.*, 36: 209-212.
- Smith C.E., Morrison J. K. & Ramsey H.W. (1982). Proliferative kidney disease: first outbreak in North America. *Fish Health News*, 10: 3-5.
- Taticchi M.I., Gustinelli A., Fioravanti M.L., Caffara M., Pieroni G. & Prearo M. (2004). Is the worm-like organism found in the statoblasts of *Plumatella fungosa* (Bryozoa, Phylactolaemata) the vermiform phase of *Tetracapsuloides bryosalmonae* (Myxozoa, Malacosporea)? *Ital. J. Zool.*, 71: 143-146.
- Tops S., Baxa D.V., McDowell T.S., Hedrick R.P. & Okamura B. (2004). Evaluation of malacosporean life cycles through transmission studies. *Dis. Aquat. Org.*, 60: 109-121.