

# XXVII Convegno Nazionale SIPI

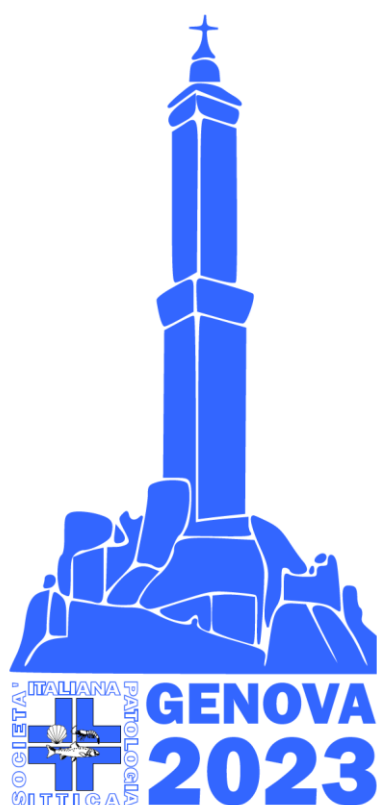
Società Italiana di Patologia Ittica



## ATTI CONVEGNO

**GENOVA, 22-24 giugno 2023**

**Sala del Capitano - Palazzo San Giorgio – via della Mercanzia, 2**



**Atti del**  
**XXVII CONVEGNO NAZIONALE S.I.P.I.**  
**Società Italiana di Patologia Ittica**

**GENOVA, 22-24 giugno 2023**

**Sala del Capitano - Palazzo San Giorgio – via della Mercanzia, 2**

### **Comitato organizzatore:**

Elena Bozzetta  
Silvia Colussi  
Giuseppe Esposito  
Andrea Gustinelli  
Paolo Pastorino  
Nicola Pussini

### **Comitato scientifico:**

Paola Beraldo  
Antonia Concetta Elia  
Maria Letizia Fioravanti  
Marino Prearo

### **Segreteria:**

Alessandra Silvagni  
Anna Toffan

## Patrocinato da:



ORDINE  
DEI MEDICI VETERINARI  
della provincia di  
**GENOVA**

## Con il contributo di:



# **PROGRAMMA**

# XXVII Convegno Nazionale S.I.P.I.

Società Italiana di Patologia Ittica

Genova 22-24 giugno 2023

*Programma convegno*

*Prima giornata – giovedì 22 giugno 2023*

08.30-09.15 **Registrazione dei partecipanti**

09.15-10.00 **Apertura dei lavori e saluti**

Saluti del presidente SIPI – Prof. Andrea Gustinelli – UNIBO

Saluti delle autorità: Dott Ferrari Angelo, DG f.f. IZSPLV

Ordine dei Veterinari di Genova

Ordine dei Biologi del Piemonte, Liguria e Val D'aosta

## **10.00-11.10 I sessione lavori scientifici - Patologie virali**

Moderatore: Dott. Francesco Pascoli

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie

10.00-10.10 **01 - INDAGINE VIROLOGICA IN SARCOMI CUTANEI MULTIPLI IN *CARASSIUS AURATUS***

Errani F., Mandrioli L., Zamparo S., Renzi A., Morini M., Volpe E., Ciulli S.

10.10-10.20 **02 - CAMBIAMENTO DI PARADIGMA NELL'INTERVALLO DI TEMPERATURA DELLA NECROSI EMATOPOIETICA INFETTIVA: EVIDENZE *IN VITRO***

Buratin A., Marsella A., Toson M., Abbadi M., Toffan A.

10.20-10.30 **03 - CAMBIAMENTO DI PARADIGMA NELL'INTERVALLO DI TEMPERATURA DELLA NECROSI EMATOPOIETICA INFETTIVA: EVIDENZE *IN VIVO***

Marsella A., Buratin A., Pascoli F., Abbadi M., Toson M., Cuenca A., Vendramin N., Toffan A.

10.30-10.40 **04 - COINFEZIONE DA *BETANODAVIRUS* E *VIBRIO HARVEYI* IN UN EPISODIO AD ELEVATA MORTALITÀ IN SPIGOLE (*DICENTRARCHUS LABRAX*) ALLEVATE IN SARDEGNA**

Polinas M., Murgia C., Schleicherová D., Pastorino P., Esposito G., Burrai G.P., Colussi S., Barbera G.; Prearo M., Antuofermo E.

10.40-10.50 **05 - MONITORAGGIO DI UN EPISODIO DI ACIPENSER IRIDOVIRUS EUROPEAN (ACIV-E) IN STORIONI RUSSI (*ACIPENSER GUELLENSTAEDTII*) ALLEVATI**

Toffan A., Paoli F., Abbadi M., Pretto T., Cortinovis L., Brocca G., Quaglio F.

10.50-11.00 **06 - RITROVAMENTO DI *BETANODAVIRUS* IN CERNIE BRUNE (*EPINEPHELUS MARGINATUS*) PROVENIENTI DA ITALIA (LIGURIA) E PRINCIPATO DI MONACO**

Volpe E., Mandrioli L., Errani F., Garcia Hartmann, M., Merotto L., Girons A., Ciulli S.

11.00-11.10 **Discussione**

11:10-11.45 *Coffee break + sessione poster*

**11.45-13.05 II sessione lavori scientifici - Patologie batteriche**

Moderatore: Dott. Adelchi Accini  
Skretting Italia SpA

11.45-11.55 **07 - MICOBATTERI ATIPICI E GRANULOMI MULTIPLI NELL'OMBRINA BOCCADORO DI ALLEVAMENTO (*ARGYROSUMUS REGIUS*): GRANULOMATOSI SISTEMICA O MICOBATTERIOSI?**  
Antuofermo E., Murgia C., Cubeddu T., Sanna M.A., Dei Giudici S., Polinas M., Schleicherová D., Zanolì A., Barbera G., Burrai G.P., Prearo M.

11.55-12.05 **08 - *LACTOCOCCUS PETAURI*: AGENTE ZOONOTICO EMERGENTE?**  
Colussi S., Pastorino P., Prearo M., Sciuto S., Bondavalli F., Acutis P.L., Bozzetta E., Amisano F., Salerno A.

12.05-12.15 **09 - *PHOTOBACTERIUM DAMSELAE* SUBSP. *PISCICIDA*: PROVISIONAL EPIDEMIOLOGICAL CUT-OFF CONTRO I PRINCIPALI ANTIBIOTICI IN USO IN ACQUACOLTURA**  
Cortinovis L., Pretto T., Toson M., Manfrin A.

12.15-12.25 **10 - IDENTIFICAZIONE DI FATTORI DI PATOGENICITÀ (*WECC-1*, *WECC-2*) IN CEPPI DI *CARNOBACTERIUM MALTAROMATICUM* ISOLATI IN EPISODI DI MORTALITÀ DI *RANA TEMPORARIA***  
Pastorino P., Alberti S., Di Blasio A., Sciuto S., Esposito G., Barceló D., Dondo A., Acutis P.L., Prearo M., Colussi S.

12.25-12.35 **11 - AN INTEGRATED APPROACH TO INVESTIGATE SPONTANEOUS LACTOCOCCOSIS IN FARMED RAINBOW TROUT (*ONCORHYNCHUS MYKISS*)**  
Khalil S.M.I., Saccà E., Galeotti M., Sciuto S., Colussi S., Pastorino P., Esposito G., Montemurro V., Pezzolato M., Volpatti D.

12.35-12.45 **12 - CASO DI FLAVOBATTERIOSI DA *FLAVOBACTERIUM PSYCHROPHILUM* IN STORIONE SIBERIANO (*ACIPENSER BAERI*)**  
Cortinovis L., Pretto T., Manfrin A.

12.45-12.55 **13 - GASTRITE GRANULOMATOSA IN TROTA IRIDEA (*ONCORYNCHUS MYKISS*)**  
Beraldo P., Orioles M., Volpatti D., Galeotti M.

12.55-13.05 **Discussione**

13.05-14.40 *Light lunch + sessione poster*

**14.40-15.50 III sessione lavori scientifici - Patologie parassitarie + Miscellanea**

Moderatore: Dott.ssa Manuela Dalla Pozza  
Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie

- 14.40-14.50 **14 - INDAGINE PARASSITOLOGICA SU GRANCHIO BLU (*CALLINECTES Sapidus*) IN ALTO ADRIATICO**  
Gustinelli A., Are R., Caffara M., Tedesco P., Quaglio F., Fioravanti M.L.
- 14.50-15.00 **15 - PRIMA SEGNALEZIONE DI *PHILOMETROIDES Sanguineus* (NEMATODA: PHILOMETRIDAE) IN PESCI ROSSI (*CARASSIUS Auratus*) ALLEVATI IN PIANURA PADANA**  
Pirolo T., Tedesco P., Cantori A., Caffara M., Tentoni E., Tarocchi L., Fioravanti M.L., Gustinelli A.
- 15.00-15.10 **16 - CASI CHIRURGICI TRATTATI CON LASERTERAPIA E DIAGNOSI MORFOLOGICA DI TRE NEOPLASIE CUTANEE IN CARASSI DORATI**  
Corradini C., Cocumelli C., Caldarelli F., Di Giamberardino F., Amati S., Gennari F.; Bossù T.
- 15.10-15.20 **17 - BENESSERE ALLA MACELLAZIONE DEI PESCI IN ITALIA: SITUAZIONE ATTUALE IN UN QUADRO NORMATIVO EUROPEO IN EVOLUZIONE**  
Clemente G. A., Tolini C., Lorenzi V., Dal Lago T., Benedetti D., Bellucci F., Manfrin A., Trocino A., Rota Nodari S.
- 15.20-15.30 **18 - LA PARTENOGENESI NEGLI ELASMOBRANCI: PRIMO CASO RIPORTATO DEL PALOMBO COMUNE *MUSTELUS MUSTELUS***  
Esposito G., Pastorino P., Sciuto S., Meletiadis A., Gagliardi F., Pira A., Corrias I., Acutis P.L., Bozzetta E., Dondo A., Prearo M., Colussi S.
- 15.30-15.40 **19 - ISOLAMENTO E PRIMA CARATTERIZZAZIONE DI LINEE CELLULARI DI STORIONE RUSSO (*ACIPENSER GUELLENSTAEDTII*)**  
Lucon Xiccato R., Quartesan R., Toffan A.
- 15.40-15.50 **20 - IMPIEGO DI eDNA NELLA RILEVAZIONE DI PATOGENI ITTICI**  
Pretto T., Paolini V., Cortinovis L., Basso A.
- 15.50-16.00 **Discussione**
- 20.00 **Cena sociale** presso il ristorante “il Cadraio”  
Vico Dietro Il Coro della Maddalena, 26, Genova  
Tel. 010 247 4095



*Seconda giornata - venerdì 23 giugno 2023*  
*Workshop ECM: "La selezione genetica alle malattie per un'acquacoltura resiliente"*

- 08.30-09.30 **Registrazione dei partecipanti**  
**Apertura dei lavori e saluti**  
**Saluti dei moderatori** : Elena Bozzetta - Silvia Colussi– IZSPLV
- 09.30-10.00 **Basi della selezione genetica**  
Sara Faggion - Università degli Studi di Padova
- 10.00-10.30 **Application examples of selection plans: salmonids**  
Diego Robledo - The Roslin Institute, Università di Edimburgo
- 10.30-11.00 **Application examples of selection plans for Mediterranean marine species**  
Marc Vandeputte - National Research Institute for Agriculture, Food and the Environment
- 11.00-11.30 Coffee break*
- 11.30-12:00 **Contributo pratico relativo alla gestione degli stock**  
Lucio Fariano - Azienda Agricola Canali Cavour
- 12.00-12:30 **Criobiologia del seme per la conservazione degli stock ittici e mantenimento della variabilità genetica**  
Luciano Foglio - Istituto Sperimentale Italiano "Lazzaro Spallanzani"
- 12.30-13.00 **Discussione**
- 13.00-14.30 Light lunch*
- 14.30-15.00 **Output from PerformFISH & FutureEUAqua project**  
Konstantinos Tsingenopoulos - Hellenic centre for marine research (HCMR)
- 15.00-15.30 **Output progetto Supertrout**  
Silvia Colussi - Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria, Valle d'Aosta
- 15.30-16.00 **Output progetti Aquafaang - Fishboost**  
Luca Bargelloni - Università degli studi di Padova
- 16.00-16.30 **Discussione**
- 16.30-17.00 **Premiazioni**
- 17.00-18:00 **Assemblea dei soci SIPI**

*Terza giornata - sabato 24 giugno 2023*  
*Study visit*

09.00-13.00 **Visita tecnica All'Aquario di Genova**  
Ritrovo ore 09.00 di fronte all'Acquario di Genova (lato banchina del porto)



## POSTER PRESENTATI:

- 1- **VALUTAZIONE DELL'EFFETTO DI UN DISINFETTANTE SULLO STRESS OSSIDATIVO IN ZEBRAFISH (*DANIO RERIO*)**  
Abbà M., Tramuta C., Bondavalli F., Caldaroni B., Varello K., Esposito G., Montemurro V., Magara G., Pastorino P., Squadrone S., Abete M.C., Bozzetta E., Elia A.C., Prearo M.
- 2- **MONITORAGGIO DELLO STATO DI SALUTE DELL'OSTRICA (*CRASSOSTREA GIGAS*) ALLEVATA IN SARDEGNA IN RELAZIONE AI PARAMETRI AMBIENTALI: STUDIO ISTOLOGICO E MOLECOLARE**  
Asara G., Antuofermo E., Polinas M., Sanna M.A., Alberti A., Murgia C., Melillo R., Burrai G.P., Ruiu A., Mandas D.
- 3- **RILEVAZIONE AMBIENTALE DI *YERSINIA RUCKERI* IN TROTTICOLTURA: METODOLOGIE E RISULTATI PRELIMINARI**  
Bezzo Llufrío T., Schleicherova D., Abbà M., Pastorino P., Prearo M.
- 4- **EPISODIO DI MORTALITA' ASSOCIATA AD INFEZIONE DA *AEROMONAS VERONII* BIOVAR *SOBRIA* IN SPIGOLE (*DICENTRARCHUS LABRAX*) ALLEVATE IN GABBIA IN ITALIA**  
Bignami G., Quaglio F., Zanoni R.G., Fioravanti M.L., Gustinelli A.
- 5- **PRIMA SEGNALAZIONE DI *LACTOCOCCUS CARNOSUS* IN TROTA FARIO (*SALMO TRUTTA*)**  
Bondavalli F., Colussi S., Pastorino P., Esposito G., Abbà M., Bezzo Llufrío T., Acutis P.L., Prearo M.
- 6- **AGGIORNAMENTO SULLA PREVELENZA DI IRIDOVIRUS NEGLI ALLEVAMENTI DI STORIONI IN NORD ITALIA NEL TRIENNIO 2021-2023**  
Bondavalli F., Schleicherova D., Mugetti D., Pastorino P., Gabetti A., Maganza A., Arsieni P., Dondo A., Prearo M.
- 7- **PRIMA SEGNALAZIONE DI *LACTOCOCCUS PETAURI* IN PERSICO SOLE (*LEPOMIS GIBBOSUS*) SUL TERRITORIO ITALIANO**  
Bondavalli F., Colussi S., Pastorino P., Esposito G., Bezzo Llufrío T., Zanolì A., Acutis P.L., Prearo M.
- 8- **INTERVENTI A SUPPORTO DELLO SVILUPPO AVANZATO, INTEGRATO E SOSTENIBILE DELL'ACQUACOLTURA**  
Capparucci F., Iaria C., Natale S., Lanteri G., Marino F.
- 9- **TEST IN VITRO DI FAGOCITOSI IN CELLULE IMMUNITARIE DEL BIVALVE A RISCHIO DI ESTINZIONE *PINNA NOBILIS***  
Carella F., Prado P., García-March J.R., Tena-Medialdea J., Cortés Melendreras E., Giménez Casalduero F., Feola A., Porcellini A.
- 10- **STUDIO PRELIMINARE DELLA PERKINSOSI (*P. OLSENI*) NEL MITILO MEDITERRANEO (*M. GALLOPROVINCIALIS*) NELLA REGIONE CAMPANIA**  
Carella F., Villari G., Paduano G., Lucibelli M.G., D'Angelo L., Di Lecce E., Di Nocera F.

- 11- ISOLAMENTO DI GAMMAPROTEOBATTERI IN SPECIE ABISSALI: RISULTATI PRELIMINARI**  
Colussi S., Pastorino P., Maganza A., Gabetti A., Marongiu C., Bondavalli F., Dondo A., Acutis P.L., Prearo M., Esposito G.
- 12- ANISAKIS & PREVENZIONE: UN VIAGGIO DALLA TRANSILLUMINAZIONE ALLA LAMP VERSO UNA MIGLIORE PROTEZIONE DEL CONSUMATORE E DELL'OPERATORE DEL SETTORE**  
Costa A., Patamia I., Fortino G., Cammilleri G., Costa A., Ferrantelli V.
- 13- STUDIO PRELIMINARE SULL'INFESTAZIONE DA *PROTEOCEPHALUS LONGICOLLIS* IN AGONE (*ALOSA FALLAX LACUSTRIS*) PESCATI NEL LAGO DI GARDA**  
De Benedetto G., Corti I., Malandra R., Riolo K., Giannetto A., Gaglio G.
- 14- CARATTERIZZAZIONE MORFOLOGICA E MOLECOLARE DI STADI ACTINOSPOREI DI PARASSITI MYXOZOA IN *BRANCHIURA SOWERBYI* (ANNELIDA: *OLIGOCHAETA*)**  
DeVos M., Cantori A., Luci V., Passarini A., Gustinelli A., Fioravanti M.L., Caffara M.
- 15- VALUTAZIONE PRELIMINARE DELLE MISURE DI BIOSICUREZZA NELLE TROTTICOLTURE DELLA PROVINCIA AUTONOMA DI TRENTO**  
Franzago E., Dorotea T., Casarotto C., Marchetti G., Bonato P., Dalla Pozza M., Toson M., Bille L.; Cocco A., Callegaro A., Lunardi L., Mulatti P., Toffan A., Dellamaria D., Bortolotti L., Fabris A., Mazzucato M.
- 16- PESCI ALIENI NELLE ACQUE INTERNE ITALIANE: POTENZIALE IMPATTO SANITARIO SULLE SPECIE ACQUATICHE AUTOCTONE**  
Gabetti A., Maganza A., Esposito G., Pizzul E., Bertoli M., Prearo M., Pastorino P.
- 17- PROGETTO "LAGHI VIVI 2.0" REALIZZAZIONE DI UN CENTRO ITTIOGENICO PER LA VALORIZZAZIONE, CONSERVAZIONE E SVILUPPO SOSTENIBILE DEL PATRIMONIO LACUSTRE SICILIANO IN ATTUAZIONE DELLA MISURA A TITOLARITA' N. 2.51 DEL PO - FEAMP 2014-2020 SULL'AREALE DEL LAGO BIVIERE DI LENTINI.**  
Iaria C., Capparucci F., Gervasi C., Lanteri G., Marino F.
- 18- DEVELOPMENT OF FUNCTIONAL FISH FEED BASED ON BIOACTIVE COMPOUNDS OF MARINE AND HERBAL ORIGIN**  
Iaria C., Capparucci F., Romito F., Lanteri G., Marino F.
- 19- LESIONI PROLIFERATIVE ASSOCIATE A INFEZIONI DA PARASSITI MYXOZOA IN *CARASSIUS AURATUS* ALLEVATI IN ITALIA**  
Luci V., Tedesco P., Gustinelli A., Cantori A., Verin R., Quaglio F., Fioravanti M.L., Caffara M.
- 20- PATOLOGIE VIRALI E BATTERICHE RILEVATE NELLE PISCICOLTURE ITALIANE DAL 2018 AL 2022**  
Lunardelli G., Franzago E., Dalla Pozza M., Toson M., Bille L., Rizzo S., Marsella A., Cocchi M., Manfrin A., Prearo M., Pastorino P., Salogni C., Susini F., Cardeti G., Bossù T., Agnetti F., Ferri N., Di Nocera F., Fusco G., Amoroso M., Guarino L., Vicari D., Cappai S., Toffan A.

**21- LA PRODUZIONE ITTICA DA ACQUAPONICA: PROBLEMI E BENEFICI**

Maganza A., Gabetti A., Schleicherová D., Pastorino P., Menconi V., Prearo M., Esposito G.

**22- ISOLAMENTO DI *CARNOBACTERIUM MALTAROMATICUM* IN ESEMPLARI DI GATTUCCIO (*SCYLIORHINUS CANICULA*) IN UN ACQUARIO PUBBLICO**

Pastorino P., Colussi S., Bondavalli F., Gagliardi F., Corrias I., Pira A., Acutis P.L., Prearo M., Esposito G.

**23- VALUTAZIONE DELL'ANTIBIOTICORESISTENZA IN ISOLATI BATTERICI DA PESCI ORNAMENTALI D'IMPORTAZIONE NEL PERIODO 2020-2023**

Prearo M., Bondavalli F., Pastorino P., Tomasoni M., Abbà M., Bezzo Llufrío T., Zanolí A., Maganza A., De Vita V., Amato G., Marra C., Dondo A., Zoppi S.

**24- MONITORAGGIO SANITARIO IN PESCI ORNAMENTALI D'IMPORTAZIONE NEL TRIENNIO 2020-2023**

Prearo M., Pastorino P., Bondavalli F., Menconi V., Esposito G., Tomasoni M., Mugetti D., Abbà M., Bezzo Llufrío T., Zanolí A., Gabetti A., Amato G., De Vita V., Dondo A.

**ABSTRACT**  
**Comunicazioni orali**

## INDAGINE VIROLOGICA IN SARCOMI CUTANEI MULTIPLI IN CARASSIUS AURATUS

Errani F.<sup>1</sup>, Mandrioli L.<sup>1</sup>, Zamparo S.<sup>1</sup>, Renzi A.<sup>1</sup>, Morini M.<sup>1</sup>, Volpe E.<sup>1</sup>, Ciulli S.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Alma Mater Studiorum Università di Bologna, Ozzano dell'Emilia (BO)*

I virus vengono spesso associati nei pesci a masse proliferative e neoplastiche. In alcuni casi il ruolo di questi virus è stato ben accertato come nel caso della linfocisti o del carp pox, causati rispettivamente dal virus della linfocisti (LCDV) e dal ciprinid herpesvirus 1 (CyHV-1), mentre in altri l'associazione è più debole. In particolare, l'associazione tra tumorigenesi e agenti infettivi come herpesvirus e retrovirus non è sempre stata stabilita con certezza basandosi talvolta sulla sola rilevazione di particelle virali all'indagine ultrastrutturale o sulla rilevazione di attività di trascrittasi inversa come segno di possibile presenza di un retrovirus, tal altra sull'isolamento e sequenziamento del virus. Solo in alcuni casi è stato possibile riprodurre sperimentalmente la neoplasia in nuovi soggetti mediante esposizione a filtrati, privi di cellule, derivanti da tessuto tumorale omogenizzato.

Una possibile eziologia virale è stata ipotizzata anche nei sarcomi cutanei del carassio essendo stato isolato un virus da organi interni di soggetti affetti da neurofibromatosi. Comunque non è stato possibile riprodurre i tumori a seguito di infezione sperimentale con il virus isolato.

Al fine di indagare la possibile eziologia virale di questi tumori è stata condotta una ricerca virologica in popolazioni di carassi con masse cutanee multiple. In particolare è stata inizialmente esaminata una popolazione di pesci rossi mantenuta in un laghetto privato: più di metà della popolazione presentava masse cutanee multiple suggerendo un'eziologia infettiva. La popolazione è stata monitorata dal 2019 al 2023 e campionata due volte a distanza di due anni. L'esame citologico delle masse cutanee multiple prelevate dai soggetti colpiti ha evidenziato la presenza di tumori a cellule fusate, classificati istologicamente come sarcomi dei tessuti molli (STS) dermici. Nel 2022 è stato inoltre aggiunto all'indagine un carassio con diversa origine geografica che presentava lesioni analoghe. La ricerca virologica è stata condotta a partire da campioni di tessuto cutaneo patologico, milza, rene e fegato utilizzando la linea cellulare Koi-Fin 1 (KF-1). Inoltre sono state condotte indagini molecolari, tramite PCR, per rilevare l'eventuale presenza di virus solitamente associati allo sviluppo di lesioni cutanee proliferative e neoplastiche come ad esempio il virus della linfocisti (LCDV) e il Cyprinid Herpesvirus 1 (CyHV-1). Infine alcuni tessuti neoplastici sono stati sottoposti ad indagine ultrastrutturale.

A differenza di quanto precedentemente riscontrato nel carassio con neurofibromatosi, nessun effetto citopatico è stato evidenziato nelle colture cellulari inoculate. Inoltre, le indagini molecolari non hanno riscontrato la presenza di virus nei campioni cutanei analizzati. Infine, nessuna particella virale è stata rilevata dalle indagini ultrastrutturali.

Nonostante la diffusione dei tumori nella popolazione esaminata suggerisse una eziologia infettiva, al momento dall'analisi condotta non è emersa la presenza di agenti virali nei tessuti di carassi affetti da sarcomi cutanei multipli, facendo ipotizzare una diversa eziologia di questi tumori.

## **CAMBIAMENTO DI PARADIGMA NELL'INTERVALLO DI TEMPERATURA DELLA NECROSI EMATOPOIETICA INFETTIVA: EVIDENZE *IN VITRO***

Buratin A., Marsella A., Toson M., Abbadì M., Toffan A

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro, Italy*

Negli ultimi anni, la necrosi ematopoietica infettiva (IHN) ha mostrato un aumento della sua diffusione, con focolai che si sono verificati in Paesi precedentemente indenni come la Danimarca e la Finlandia. Il ceppo di IHNv responsabile dei focolai in Danimarca è stato isolato in campioni di sorveglianza a temperature prossime ai 20°C, le quali risultano particolarmente elevate per questa specie virale. Studi precedenti hanno dimostrato per i genotipi U e M dell'IHNv la capacità di replicare in coltura cellulare e di indurre malattia nella trota iridea, *Oncorhynchus mykiss*, e nel salmone rosso, *O. nerka*, anche a 20°C. Questa caratteristica non è mai stata dimostrata per i ceppi europei di IHNv, che invece appartengono al genotipo E. Una valutazione retrospettiva ha evidenziato l'esistenza di alcuni focolai di IHN verificatisi a temperature superiori a 15°C in Italia. L'ipotesi alla base del presente studio è quindi che questa specie virale sia caratterizzata da un intervallo termico più ampio di quanto finora ritenuto. Una selezione di ceppi di IHNv, comprendente l'isolato danese ed alcuni isolati italiani, sono stati analizzati per la loro capacità replicativa a diverse temperature di incubazione. Lotti virali a titolo noto sono stati sottoposti a titolazione mediante saggi di diluizioni end-point su monostrati di cellule EPC infettati con MOI 1 ed incubati a 15°C, 20°C, 22°C e 25°C. La comparsa di effetto citopatico è stata monitorata quotidianamente e i titoli sono stati calcolati secondo la formula di Reed & Muench per ogni giorno fino a sette giorni dopo l'inoculazione. I titoli osservati hanno mostrato un alto grado di variabilità dei ceppi di IHNv in relazione alla loro sensibilità alla temperatura. L'isolato danese e alcuni ceppi italiani hanno replicato senza riduzioni significative del titolo virale alla temperatura di 22°C. Gli stessi ceppi hanno replicato, seppur con una riduzione significativa del titolo virale, anche quando incubati alla temperatura di 25°C. Gli altri ceppi testati hanno invece dimostrato di essere più sensibili alle temperature, con una ridotta o assente crescita già a 20°C. I dati ottenuti dimostrano quindi un intervallo di temperatura più ampio dell'atteso per i ceppi IHNv appartenenti al genotipo E. La tolleranza alla temperatura sembra essere legata all'ambiente di origine piuttosto che all'anno di isolamento del virus, considerato che i ceppi italiani più resistenti alle temperature derivano da stabilimenti di pianura o di zone con un clima più temperato.

Sulla base dei risultati ottenuti, si rende necessario un cambiamento all'approccio alla diagnosi e sorveglianza dell'IHN, che dovrebbe essere preso in considerazione anche a livello normativo.

*Il progetto di Ricerca Corrente IZSVe RC 13/19 è stato finanziato dal Ministero della Salute.*



## **CAMBIAMENTO DI PARADIGMA NELL'INTERVALLO DI TEMPERATURA DELLA NECROSI EMATOPOIETICA INFETTIVA: EVIDENZE *IN VIVO***

Marsella A.<sup>1</sup>, Buratin A.<sup>1</sup>, Pascoli F.<sup>1</sup>, Abbadi M.<sup>1</sup>, Toson<sup>1</sup>, M., Cuenca A.<sup>2</sup>, Vendramin N.<sup>2</sup>, Toffan<sup>1</sup> A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro, Italy - <sup>2</sup>Technical University of Denmark, Lyngby, Denmark

Studi precedenti hanno dimostrato per ceppi appartenenti ai genotipi U e M della Necrosi Ematopoietica Infettiva la capacità di indurre malattia a temperature prossime ai 18°C. Tale possibilità non è stata dimostrata per il genotipo E, genotipo al quale appartengono gli isolati europei. Comunemente, in Europa l'IHN è ritenuta una malattia di acqua fredda che si manifesta sotto i 14°C, ma evidenze di campo suggeriscono invece un range termico più ampio. Prove preliminari eseguite *in vitro* hanno dimostrato per ceppi di IHNv, appartenenti al genotipo E e diversi per anno e temperatura dell'acqua di isolamento, una capacità replicativa a temperature di incubazione prossime a 20°C. Tale capacità è fortemente variabile a seconda del ceppo valutato.

Una selezione di ceppi di IHNv, comprendente il ceppo di IHNv responsabile di focolai di malattia in Danimarca (DK 21-4070), un ceppo italiano isolato a 12°C e altamente patogeno in trota iridea (IHN 224-2) e un ceppo italiano isolato a 16°C (IHN 67-1), è stata utilizzata per la valutazione della patogenicità in trota iridea a diverse temperature di stabulazione.

Giovanili di trota iridea del peso medio di circa 1,5 grammi sono stati stabulati a 12°C e a 19°C, infettati per bagno con i vari ceppi virali alla dose di 10<sup>5</sup> TCID<sub>50</sub>/ml ed osservati per 28 giorni post infezione. Terminato il periodo di osservazione, sono state rilevate differenze nella mortalità indotta dal ceppo IHN 224-2 che è risultata estremamente ridotta a 19°C. Il ceppo DK 21-4070 è risultato altamente patogeno a 12°C ma in misura minore a 19°C. Rilevante è stato il comportamento patogeno del ceppo IHN 67-1 che ha indotto mortalità elevate ad entrambe le temperature di stabulazione. I dati ottenuti nella prova *in vivo* confermano i risultati ottenuti nelle prove *in vitro*, dimostrando quindi un intervallo di temperatura più ampio per la manifestazione di IHN causata da ceppi virali appartenenti al genotipo E. Fattori intrinseci ai ceppi virali coinvolti determinano la temperatura permissiva per l'insorgenza della malattia e i livelli di mortalità indotti. Ulteriori analisi sono necessarie per identificare i meccanismi alla base di tali differenze.

*Il presente studio è stato finanziato dal progetto europeo Aquaexcel 3.0 e dal progetto di ricerca corrente IZSVE RC13/19 finanziato dal Ministero della Salute.*

## COINFEZIONE DA *BETANODAVIRUS* E *VIBRIO HARVEYI* IN UN EPISODIO AD ELEVATA MORTALITÀ IN SPIGOLE (*DICENTRARCHUS LABRAX*) ALLEVATE IN SARDEGNA

Polinas M.<sup>1</sup>, Murgia C.<sup>1</sup>, Schleicherová D.<sup>2</sup>, Pastorino P.<sup>2</sup>, Esposito G.<sup>2</sup>, Burrascano G.P.<sup>1</sup>, Colussi S.<sup>2</sup>, Barbera G.<sup>3</sup>, Prearo M.<sup>2</sup>, Antuofermo E.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Sassari, 07100 Sassari, Italia; <sup>2</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Piemonte, Liguria and Valle d'Aosta, 10154 Torino, Italia; <sup>3</sup>Gruppo Riservazzurra S.r.l., 09072 Cabras (OR), Italia

I fenomeni di mortalità nei pesci possono essere associati all'azione di due o più patogeni in grado di determinare una coinfezione nell'ospite. Tra gli agenti virali, i *Betanodavirus* sono responsabili di una delle patologie maggiormente devastanti in acquacultura, l'encefalo-retinopatia virale, che colpisce le spigole (*Dicentrarchus labrax*) ed altre specie ittiche. Tra i batteri, *Vibrio harveyi* è stato segnalato come uno dei maggiori agenti della vibriosi nel Mediterraneo, patologia caratterizzata da atassia natatoria, ulcere cutanee e gastro-enteriti. Lo scopo del presente lavoro è stato quello di indagare su un episodio ad elevata mortalità, in un allevamento intensivo di spigole (*Dicentrarchus labrax*) della costa occidentale della Sardegna, associato al riscontro di segni neurologici come anomalie di movimento (nuoto a spirale). Nell'agosto 2022 (T dell'acqua  $\geq 27^{\circ}\text{C}$ ), 40 spigole, del peso medio di 250 gr, provenienti da differenti lotti dello stesso allevamento, sono stati inviati al Dipartimento di Medicina Veterinaria di Sassari per le analisi istologiche (n=10) e all'Istituto Zooprofilattico di Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta di Torino per le analisi microbiologiche e molecolari (n=30). In seguito all'esame necroscopico gli organi sono stati fissati in formalina tamponata al 10% ed inclusi in paraffina. Sezioni da 3  $\mu\text{m}$  sono state colorate con ematossilina-eosina e valutate al microscopio ottico. La ricerca dei virus è stata condotta sui campioni di cervello dei 30 soggetti tramite PCR e successivo sequenziamento. Le indagini microbiologiche, effettuate su rene, cervello e occhio hanno previsto l'allestimento di colture su terreni di primo isolamento e successivamente l'analisi delle colonie con tecnica Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization -Time of Flight (MALDI-TOF). Le spigole hanno mostrato erosioni ed emorragie cutanee multifocali nella regione della testa, bocca, opercoli ed emorragie multifocali a carico delle meningi e dell'encefalo. All'esame istologico, in 10/10 soggetti è stata osservata una moderata, multifocale encefalite granulomatosa cronica, associata a diffusa gliosi, congestione vascolare e perivasculite. Vacuolizzazioni encefaliche e retiniche, localizzate negli strati dei granuli interni e delle cellule gangliari, erano maggiormente evidenti in alcuni soggetti. Inoltre, in 2/10 soggetti è stata osservata disepitelizzazione della mucosa intestinale associata ad una grave e diffusa enterite macrofagica cronica e necrosi di singoli epatociti. Le analisi virologiche hanno rilevato, mediante PCR e successivo sequenziamento, Nodavirus del genotipo Red-Spotted Grouper Nervous Necrosis Virus (RGNNV) in 29/30 soggetti. Inoltre, l'esame microbiologico, con successiva conferma con MALDI-TOF, ha identificato *Vibrio harveyi* in 7/30 spigole, positive anche al Nodavirus. Questo lavoro descrive la prima segnalazione di coinfezione da Nodavirus e *Vibrio harveyi* associato ad un episodio di elevata mortalità nelle spigole. È, quindi, auspicabile considerare maggiormente il ruolo di *Vibrio harveyi* in episodi ad elevata mortalità in spigole che mostrano segni neurologici riconducibili all'encefalo-retinopatia virale da *Betanodavirus*.

## MONITORAGGIO DI UN EPISODIO DI ACIPENSER IRIDOVIRUS EUROPEAN (ACIV-E) IN STORIONI RUSSI (ACIPENSER GUELLENSTAEDTII) ALLEVATI

Toffan A.<sup>1</sup>, Paoli F.<sup>2</sup>, Abbadi M.<sup>1</sup>, Pretto T.<sup>1</sup>, Cortinovis L.<sup>1</sup>, Brocca G.<sup>2,3</sup>, Quaglio F.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Istituto Zooprofilattico delle Venezie, Legnaro, PD; <sup>2</sup>Dipartimento di Biomedicina comparata e alimentazione (BCA), Agripolis, Legnaro PD; <sup>3</sup>Aquatic Diagnostic Services, Atlantic Veterinary College, University of Prince Edward Island, Charlottetown, PE, Canada.

Una storionicoltura sita in Lombardia ed oggetto del presente monitoraggio ha iniziato a produrre storione russo (*Acipenser gueldenstaedtii*) a partire dal 2015 in seguito all'acquisto di riproduttori e di giovanili provenienti da altro allevamento italiano. Già nell'estate del 2017 veniva segnalato in questo impianto un episodio di grave mortalità che interessava l'80% degli individui nel loro primo anno di vita. A partire dal 2018, sono state eseguite le prime riproduzioni di *A. gueldenstaedtii* con semina di progenie propria in allevamento. Nonostante diversi tentativi finalizzati al miglioramento del benessere dei pesci e delle condizioni di allevamento, in particolare la riduzione della densità in vasca allo scopo di limitare i fattori di stress, nell'estate 2019, 2020 e 2021 si sono ripresentati gravi eventi di mortalità con sospetta eziologia virale.

È stata pertanto iniziata un'indagine sanitaria in allevamento con la collaborazione dell'Università degli Studi di Padova e dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSVe) per accertare le cause della mortalità. Gli obiettivi della collaborazione sono stati: confermare la presenza di un agente virale, escludere concomitanti patologie infettive, seguire l'andamento della patologia identificata nell'arco del tempo ed evidenziare eventuali fattori ambientali favorenti.

Nel corso dell'estate/autunno 2021 sono stati effettuati campionamenti quindicinali di diverse matrici, sia prima sia durante la mortalità, le quali sono state analizzate mediante diverse metodiche diagnostiche (i.e. batteriologia, istologia, virologia e microscopia elettronica). Le analisi effettuate hanno evidenziato la presenza di Acipenser Iridovirus European (AcIV-E) e ne hanno correlato la comparsa con l'inizio della sintomatologia clinica e la mortalità. Il virus è stato rilevato da diverse matrici: branchie, tessuti cutanei periorali, acqua, muco, ed è stato caratterizzato mediante sequenziamento ed analisi filogenetica. L'esame istologico ha evidenziato la presenza di tipiche cellule epiteliali ipertrofiche con nucleo anfofilo in branchie e cute. L'esame batteriologico al contrario non ha evidenziato la presenza di batteri patogeni. La risoluzione della malattia, iniziata ai primi di settembre 2021, si è avuta circa 2 mesi dopo la comparsa dei primi sintomi, ma la positività all'agente eziologico è stata rilevata mediante real time PCR fino al termine del monitoraggio (6 mesi). La mortalità cumulativa osservata è stata del 15,9 %, ma con un'estrema variabilità tra vasche. La sintomatologia clinica e la mortalità si sono manifestate, sia storicamente sia nel corso del presente studio, solo nell'area dell'impianto denominata "avannotteria 2" in animali di circa 15 grammi di peso. Poiché l'avannotteria 2 è caratterizzata da un diverso approvvigionamento idrico rispetto all'area dove gli storioni erano allevati precedentemente e nella quale non erano presenti mortalità anomale, l'acqua (in assenza di sistemi di disinfezione) è stata identificata come il principale fattore di rischio per l'ingresso e la trasmissione della malattia. Al contrario, non è stata osservata nessuna correlazione significativa tra temperatura dell'acqua e andamento della malattia.

## **RITROVAMENTO DI BETANODAVIRUS IN CERNIE BRUNE (*EPINEPHELUS MARGINATUS*) PROVENIENTI DA ITALIA (LIGURIA) E PRINCIPATO DI MONACO**

Volpe E.<sup>1</sup>, Mandrioli L.<sup>1</sup>, Errani F.<sup>1</sup>, Garcia Hartmann, M.<sup>2</sup>, Merotto L.<sup>3</sup>, Girons A.<sup>4</sup>, Ciulli S.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Alma Mater Studiorum, Università di Bologna, Cesenatico, FC, Italia; <sup>2</sup>MarLab, Mougins, France; <sup>3</sup>Area Marina Protetta di Portofino, Santa Margherita Ligure, Italy; <sup>4</sup>ICTIOVET S.L., Barcelona, Spain.

L'encefalo-retinopatia virale (ERV), conosciuta anche come necrosi nervosa virale è una malattia infettiva causata da Betanodavirus e diffusa a livello globale. ERV colpisce diverse specie ittiche ed è associata a manifestazione clinica nervosa con alti tassi di mortalità. Nel bacino del Mediterraneo la ERV colpisce principalmente il branzino (*Dicentrarchus labrax*) causando ingenti perdite economiche. I betanodavirus sono stati ritrovati in numerose specie ittiche selvatiche spesso causando infezioni asintomatiche. Le cernie (famiglia Serranidae, sottofamiglia Epinephelinae) sono molto sensibili alle infezioni da Betanodavirus, infatti vengono frequentemente colpite soprattutto in Asia dove il loro allevamento è ampiamente diffuso. Nel Mediterraneo, invece, l'ERV è stata riportata in cernie selvatiche seppur con minore frequenza. Le segnalazioni finora riportate riguardano in particolare il sud Italia (Puglia e Sicilia), Tunisia, Algeria e le isole Baleari in Spagna. La maggior parte di queste segnalazioni sono state associate a fenomeni climatici straordinari caratterizzati da alte temperature dell'acqua.

In questo studio sono stati presi in esame alcuni focolai di mortalità riscontrati nel nord del Mediterraneo che hanno colpito cernie brune (*Epinephelus marginatus*) selvatiche. Le cernie colpite erano provenienti dall'area marina protetta (AMP) di Portofino in Italia e dal Principato di Monaco. I focolai analizzati si sono verificati nel 2018 e 2019 nel Principato di Monaco ed in Italia nel 2019. Quattro cernie brune che mostravano nuoto e galleggiamento anomalo nonché cecità sono state analizzate. A livello istopatologico i ritrovamenti nell'encefalo dei soggetti analizzati erano compatibili con un'infezione virale; infatti, Betanodavirus è stato isolato dal tessuto nervoso di tutte le cernie. La genotipizzazione dei virus isolati è stata eseguita attraverso il sequenziamento dei frammenti genomici RNA1 ed RNA2. L'analisi filogenetica ha mostrato un'elevata somiglianza tra i diversi ceppi virali isolati che sono risultati appartenenti al genotipo redspotted grouper nervous necrosis virus (RGNNV). Inoltre, una più ampia analisi filogenetica che ha incluso diversi ceppi di Betanodavirus isolati da pesci allevati e selvatici ha mostrato la mancanza di specie-specificità dei ceppi virali isolati da cernie; in particolare, i ceppi isolati in questo studio hanno clusterizzato con altri ceppi di betanodavirus isolati da diverse specie di pesci sia selvatici che allevati.

## MICOBATTERI ATIPICI E GRANULOMI MULTIPLI NELL'OMBRINA BOCCADORO DI ALLEVAMENTO (*ARGYROSOMUS REGIUS*): GRANULOMATOSI SISTEMICA O MICOBATTERIOSI?

Antuofermo E.<sup>1</sup>, Murgia C.<sup>1</sup>, Cubeddu T.<sup>1</sup>, Sanna M.A.<sup>1</sup>, Dei Giudici S.<sup>2</sup>, Polinas M.<sup>1</sup>, Schleicherová D.<sup>3</sup>, Zanolli A.<sup>3</sup>, Barbera G.<sup>4</sup>, Burrai G.P.<sup>1</sup>, Prearo M.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Sassari, 07100 Sassari, Italia; <sup>2</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna, 07100 Sassari, Italia; <sup>3</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Piemonte, Liguria and Valle d'Aosta, 10154 Torino, Italia; <sup>4</sup>Gruppo Riservazzurra S.r.l., 09072 Cabras (OR), Italia

L'ombrina boccadoro (*Argyrosomus regius*) è una specie ittica a rapida crescita, ideale per l'acquacoltura intensiva nel Mediterraneo. La granulomatosi sistemica (GS) nell'ombrina d'allevamento è una patologia caratterizzata dallo sviluppo di granulomi prevalentemente a carico del rene ma presenti, nei casi più gravi, in altri organi quali il cervello e l'occhio. La micobatteriosi nei pesci è descritta come una malattia sistemica cronica progressiva che colpisce le specie ittiche selvatiche e allevate, comprese le ombrine e causata da diverse specie di micobatteri atipici (*Mycobacterium marinum*, *M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. salmoniphilum*, *M. abscessus*, *M. simiae*, etc.). Entrambe le patologie presentano granulomi a differenti stadi evolutivi caratterizzati da strati di cellule epitelioidi e presenza di necrosi e/o calcificazioni all'interno del granuloma. Tuttavia, mentre la micobatteriosi sistemica individua come agenti nosologici batteri del genere *Mycobacterium* spp. generalmente positivi alla colorazione Ziehl-Neelsen (ZN), l'eziologia della GS rimane sconosciuta, sebbene l'ipotesi di un'origine non infettiva (nutrizionale/metabolica) sia ad oggi quella maggiormente accreditata. Questo studio vuole determinare la presenza di agenti patogeni in ombrine boccadoro di allevamento mostranti granulomi sistemici mediante isolamento e identificazione degli stessi. Un totale di 54 ombrine boccadoro (24 giovani e 30 adulti) provenienti da un allevamento intensivo della Sardegna sono state consegnate al Dipartimento di Medicina Veterinaria di Sassari al fine di indagare sullo stato di salute dei pesci. A seguito dell'esame necroscopico, campioni di vari organi sono stati processati per l'istologia (EE, ZN), per la microbiologia con l'utilizzo di terreni comuni e selettivi, per la PCR (gene *hsp65*) con il successivo sequenziamento degli amplificati (Sanger). All'istologia si osservavano granulomi multifocali negli organi di 30/30 adulti e 4/24 giovani ombrine, con una maggiore frequenza nel rene. La ZN su sezioni in paraffina non ha evidenziato la presenza di batteri alcool-acido resistenti. L'esame microbiologico ha permesso l'isolamento e l'identificazione esclusivamente di micobatteri atipici positivi alla colorazione ZN su terreno di coltura di Löwenstein-Jensen in 20/30 adulti e 4/24 giovani esemplari. I risultati della PCR e il sequenziamento degli amplificati hanno mostrato un'identità del 100% con *M. chelonae* negli adulti (18/20) e nei giovani (4/24) esemplari, mentre 2/20 adulti hanno mostrato un'elevata similarità con *M. immunogenum*. I risultati della microbiologia, esame imprescindibile per la ricerca di micobatteri atipici, delle analisi biomolecolari e del sequenziamento, hanno evidenziato la presenza di micobatteri atipici in tessuti di ombrina mostranti granulomi sistemici, dove l'identificazione del *M. chelonae* veniva osservata nella quasi totalità dei campioni. La Ziehl-Neelsen su sezioni istologiche, al contrario, si è dimostrata una metodica poco sensibile nella rilevazione dei micobatteri atipici. L'alta percentuale di ombrine positive ai micobatteri e la presenza di granulomi sistemici riscontrati in questo studio supporta l'ipotesi che la micobatteriosi delle ombrine e la granulomatosi sistemica possano condividere lo stesso agente causale. Gli autori suggeriscono che l'eziologia "infettiva" debba essere considerata come una plausibile causa primaria della SG nelle ombrine. Tuttavia, al fine di dimostrare con certezza l'eziologia della granulomatosi sistemica nell'ombrina sono necessari ulteriori studi, in un maggiore numero di campioni proveniente da differenti allevamenti, volti alla dimostrazione della presenza di micobatteri atipici all'interno dei granulomi ed infezioni sperimentali per confermare il loro ruolo come agenti causali della SG.

## LACTOCOCCUS PETAURI: AGENTE ZOOTICO EMERGENTE?

Colussi S.<sup>1</sup>, Pastorino P.<sup>1</sup>, Prearo M.<sup>1</sup>, Sciuto S.<sup>1</sup>, Bondavalli F.<sup>1</sup>, Acutis P.L.<sup>1</sup>, Bozzetta E.<sup>1</sup>, Amisano F.<sup>2</sup>, Salerno A.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Istituto Zooprofilattico del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Via Bologna 148, 10154 Torino; <sup>2</sup>Università degli Studi di Pavia, Scuola di Specializzazione in Microbiologia e Virologia, Viale Golgi, 19, 27100 Pavia; <sup>3</sup>S.S. Microbiologia, Ospedale SS Antonio e Margherita, Via XX Settembre, 15057 Tortona.

*Lactococcus garvieae* è un cocco Gram positivo, agente eziologico della lattococcosi e rappresenta uno dei principali patogeni ittici di interesse per specie sia dulciacquicole sia marine. Sono stati descritti molteplici casi anche in medicina umana, che portano a considerare *L. garvieae* quale patogeno emergente opportunista e potenzialmente zoonotico (Gibello et al., 2016). Il consumo di pesce crudo e latticini a latte crudo sono considerati una delle principali fonti di infezione umana. Tuttavia, le prove epidemiologiche a sostegno della trasmissione di *L. garvieae* attraverso il cibo sono ancora limitate e il ruolo di *L. garvieae* come patogeno di origine alimentare deve essere considerato con cautela. *L. garvieae* è stato considerato per lungo tempo l'unico agente eziologico della lattococcosi, ma di recente *Lactococcus petauri*, descritto come una nuova specie a seguito di una riassegnazione genomica del sottogruppo A di *L. garvieae* (Goodman et al., 2017), è stato riportato come patogeno in numerosi focolai di lattococcosi ittica, precedentemente attribuiti a *L. garvieae*. L'errata classificazione è da imputarsi alla elevata similarità genomica tra le due specie e all'impossibilità di identificarle correttamente con i metodi diagnostici routinari. Numerosi casi di *L. petauri* sono stati, infatti, correttamente classificati a seguito di un'analisi di comparazione genomica condotta a posteriori. *L. petauri* è risultato avere un'ampia diffusione nell'area Mediterranea (Grecia, Spagna e Turchia) (dati progetto Europeo SUPERTROUT), precedentemente imputate a *L. garvieae*. Non si conoscono, tuttavia, la reale prevalenza ed incidenza dei due patogeni, così come sono deficitari i dati a sostegno del reale ruolo zoonotico delle due specie.

*L. petauri* non è stato riportato, ad oggi, come causa di quadri patologici nell'uomo. Nel presente lavoro viene descritto un caso di cistite da *L. petauri* in un soggetto maschio di anni 91 con storia di carcinoma prostatico, diabete mellito tipo II e fibrillazione atriale, sottoposto a ricovero a seguito di frattura del femore avvenuta per incidente domestico. Tra gli esami clinici effettuati, l'esame delle urine mostrava la presenza di numerose emazie e leucociti all'esame microscopico del sedimento urinario. L'urinocoltura da catetere vescicale posizionato in corso di intervento chirurgico eseguito a seguito del trauma è risultata positiva con carica batterica di 10<sup>6</sup> UFC/ml, per Cocchi Gram positivi. Il microrganismo è stato isolato su agar sangue (Columbia + 5% Sangue di Montone) e identificato mediante sistema automatico Vitek2 Compact (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia) come *L. garvieae* resistente a Penicillina, Clindamicina, Tetraciclina, Trimetoprim/Sulfametoxazolo e sensibile al Ceftriaxone, Meropenem, Eritromicina e Levofloxacina. Considerato che il sistema Vitek2 Compact non è in grado di differenziare *L. garvieae* da *L. petauri*, l'isolato clinico è stato inviato al laboratorio di genetica dell'Istituto Zooprofilattico di Piemonte Liguria e Valle d'Aosta dove è stato sottoposto a identificazione molecolare, mediante analisi della regione intergenica 16S-23S r-Rna (Stoppani et al., 2023). L'analisi della sequenza ottenuta effettuata con BLAST ha consentito di classificare l'isolato come *L. petauri* (percentuale di similarità del 99.41%). Sono state, inoltre, valutate le emolisine quali fattori di patogenicità: l'isolato è risultato positivo per emolisina 2 e negativo per 1 e 3, come già riscontrato in isolati ittici di *L. petauri*. Il paziente è risultato essere un consumatore abituale di latte e formaggi. In particolare, i formaggi a latte crudo sono stati riportati quali possibili fonti di infezione per l'uomo.

Sarebbe pertanto auspicabile un monitoraggio ospedaliero dedicato a *L. garvieae*/*L. petauri* e uno studio epidemiologico per cercare di risalire alla fonte di infezione e all'eventuale coinvolgimento di alimenti di origine animale contaminati, al fine di definire il reale ruolo zoonotico esercitato da questi due patogeni.

**PHOTOBACTERIUM DAMSELAE SUBSP. PISCICIDA: PROVISIONAL EPIDEMIOLOGICAL CUT-OFF CONTRO I PRINCIPALI ANTIBIOTICI IN USO IN ACQUACOLTURA**

Cortinovis L., Pretto T., Toson M., Manfrin A.

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro (PD)*

La lotta all'antibiotico resistenza nei batteri delle specie zootecniche è uno dei temi cogenti dell'approccio One-Health. Un efficace intervento in questa direzione si basa sia sulla riduzione dell'uso di antibiotici che su un utilizzo più mirato delle molecole a disposizione. In quest'ottica risultano fondamentali le valutazioni laboratoristiche dei profili di antibiotico resistenza. Le metodiche fenotipiche che permettono di valutare l'esistenza di resistenze intrinseche ed acquisite nelle specie batteriche sono l'antibiogramma o metodo di agar-diffusione Kirby-Bauer (metodica qualitativa) e la valutazione della Minima Concentrazione Inibente (MIC) mediante macrodiluizione, microdiluizione in piastra ed e-test (metodiche quantitative). Condizione sine qua non per la corretta interpretazione dei risultati ottenuti è l'esistenza di valori soglia che permettano la categorizzazione dell'isolato batterico: per quanto riguarda il test Kirby-Bauer, quindi, i range di valori millimetrici che permettano la classificazione in "sensibile", "intermedio", "resistente"; per i risultati MIC, indipendentemente dalla metodica utilizzata, i valori di cut-off epidemiologico (Epidemiological Cut-Off o ECOFF), che permettono di differenziare ceppi batterici naive da isolati con resistenza acquisita, e di Clinical Breakpoint, che hanno invece un valore predittivo sull'esito del trattamento. Tutti questi valori sono da considerarsi specifici per ogni combinazione specie batterica – principio attivo e vengono definiti da enti competenti quali il CLSI ed EUCAST a partire da dati prodotti da gruppi di laboratori secondo metodiche standardizzate. Ad oggi, questi valori esistono per molti batteri di rilievo in medicina umana e veterinaria ma quasi nulla è disponibile per i batteri in ambito ittico, dove per valutare gli isolati d'interesse si usano valori estrapolati da quelli disponibili per altre specie batteriche. Con il fine di creare dei dataset da fornire a CLSI ed EUCAST per ampliare i valori di ECOFF a disposizione in ambito ittico è stata ideata la ricerca corrente 06/20 (finanziamento del Ministero della Salute) dal titolo "Valutazione degli Epidemiological Cut Off (ECOFF) per l'esecuzione delle Minimal Inhibitory Concentration (M.I.C.) nei confronti dei principali patogeni batterici dei pesci". Sei diversi laboratori attivi in ambito ittico hanno messo a disposizione gli isolati batterici ipoteticamente più sensibili in loro possesso delle varie specie batteriche in indagine e si sono coordinati nell'esecuzione di analisi MIC in micrometodo secondo le metodiche descritte nei manuali CLSI VET03 e VET04. Sempre seguendo i manuali CLSI, le analisi sono state accompagnate dall'esecuzione di Quality Control per assicurare la qualità dei dati prodotti. Il pannello di antibiotici testato comprende: Amoxicillina (AMX), Doxiciclina (DOX), Enrofloxacin (ENO), Eritromicina (ERY), Flumechin (UB), Florfenicolo (FFC), Ossitetraciclina (OT), Sulfametossazolo+Trimetoprim (SXT). I dati prodotti sono stati poi processati mediante il foglio di elaborazione statistico ECOFFinder (EUCAST) considerando un intervallo di confidenza del 99.5%. Tra i vari agenti eziologici presi in considerazione nella ricerca, il *Photobacterium damsela subsp. piscicida* (Pdp) è sicuramente tra i più rilevanti. La photobatteriosi è una patologia molto impattante nella maricoltura italiana, in grado di colpire sia giovanili che adulti di branzino (*Dicentrarchus labrax*) e orata (*Sparus aurata*) durante tutto l'arco dell'anno. Le analisi MIC in micrometodo su Pdp sono state eseguite da 5 dei 6 laboratori partecipanti, per un totale di 101 singoli isolati batterici testati. I valori ECOFF calcolati per le molecole in esame sono: Doxiciclina (0.25 µg/mL), Enrofloxacin (0.031 µg/mL), Eritromicina (8 µg/mL), Flumechin (0.25 µg/mL), Florfenicolo (1 µg/mL), Ossitetraciclina (0.5 µg/mL). Per quanto riguarda le molecole AMX e SXT, a causa della distribuzione bimodale dei dati raccolti, non è stato possibile stabilire valori ECOFF. Al meglio delle nostre conoscenze, questi sono i primi dati di Epidemiological Cut-Off disponibili per Pdp prodotti secondo metodiche standardizzate e rispettando i requisiti degli enti competenti. La loro applicazione nella valutazione dei profili di resistenza degli isolati diagnostici può risultare in un utilizzo più oculato degli antibiotici in acquacoltura.

## IDENTIFICAZIONE DI FATTORI DI PATOGENICITÀ (*WecC-1*, *WecC-2*) IN CEPPI DI *CARNOBACTERIUM MALTAROMATICUM* ISOLATI IN EPISODI DI MORTALITÀ DI RANA TEMPORARIA

Pastorino P.<sup>1</sup>, Alberti S.<sup>2</sup>, Di Blasio A.<sup>3</sup>, Sciuto S.<sup>1</sup>, Esposito, G.<sup>1</sup>, Barceló D.<sup>4</sup>, Dondo A.<sup>1</sup>, Acutis P.L.<sup>1</sup>, Prearo M.<sup>1</sup>, Colussi S.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Piemonte, Liguria and Valle d'Aosta, Torino; <sup>2</sup>Ente di Gestione delle Aree Protette delle Alpi Cozie, Salbertrand (TO); <sup>3</sup>ASL TO3, Pinerolo (TO); <sup>4</sup>Institute of Environmental Assessment and Water Research (IDAEA-CSIC), Barcellona.

A partire dal 2021 sono stati registrati alcuni casi di mortalità anomala di *Rana temporaria* in laghetti di alta quota in provincia di Torino (Lago delle Rane, Lago Laus e Lago di Selleries). I soggetti prelevati sono stati sottoposti ad esame necroscopico, parassitologico, batteriologico e virologico al fine di determinare le possibili cause di mortalità. Soltanto l'esame colturale è risultato positivo e le colonie sono state sottoposte ad indagini di tipo biomolecolare. Tutti e tre gli episodi sono accomunati dall'isolamento in purezza di *Carnobacterium maltaromaticum*.

Il genere *Carnobacterium* comprende diverse specie, ma solo due di queste (*C. maltaromaticum* e *C. divergens*) sono relativamente frequenti in ambiente acquatico ed isolate soprattutto a livello della flora intestinale. L'effetto patogeno sui teleostei e selaci è stato ampiamente descritto, con la presenza di quadro anatomopatologico tipico delle streptococcosi con esoftalmo, accumulo di liquido ascitico in cavità addominale e presenza di emorragie nei diversi organi. *Carnobacterium maltaromaticum* è stato anche isolato dall'umor vitreo dell'occhio di salmerini di fonte (*Salvelinus fontinalis*) e trota fario (*Salmo trutta*) catturati in tre laghi di alta quota senza sintomatologia in atto. L'isolamento di questi germi negli organismi acquatici porta ad ipotizzare come questi potenziali patogeni possano rimanere in una sorta di latenza (cosiddetto "effetto cavallo di Troia") in un organo (soprattutto occhio e cervello) per poi eventualmente esplicare azione patogena durante episodi di stress che abbassino le difese immunitarie dei soggetti colpiti.

Ciò ha condotto alcuni gruppi di ricerca (i.e., Roh *et al.*, 2020) ad indagare, a livello genomico, se vi fossero o meno differenze tra gli isolati in termini di fattori di patogenicità. I geni *WecC* sono stati precedentemente descritti quali fattori di patogenicità in batteri Gram positivi appartenenti ai generi *Streptococcus*, *Staphylococcus* e *Micrococcus*. *WecC* è infatti coinvolto nella sintesi dell'acido D-mannosaminuronico, che insieme al glucosio contribuisce alla produzione dell'acido teicuronic, uno dei principali costituenti della parete batterica. In particolare, in pesci con sintomatologia sono state riscontrate due forme paraloghe del gene *WecC*: *WecC-1* e *WecC-2* (Roh *et al.*, 2020). Nel presente studio sono stati indagati 26 ceppi di *C. maltaromaticum* isolati da esemplari di *Rana temporaria*, rinvenuti nei tre episodi di mortalità anomala sopracitati. I geni *WecC* sono stati indagati applicando il protocollo descritto da Roh *et al.* (2020): 13/26 (50%) campioni sono risultati positivi per la presenza di *WecC-1* e un campione è risultato invece positivo per *WecC-2*. Il sequenziamento del gene *WecC-1* ha evidenziato attraverso, l'analisi effettuata con BLASTn, un'identità del 100% delle sequenze ottenute con la sequenza genomica di riferimento del ceppo patogeno 18 IS Cm depositata in GenBank (Numero di accesso CP045040). Un solo ceppo, isolato da cervello, ha presentato invece un ridotto valore di identità pari a 99,33% dovuta alla presenza della mutazione g.19756 A>G. I risultati, seppur preliminari, indicano come batteri precedentemente non descritti in mortalità anomala di anfibi, in associazione con la presenza di fattori di patogenicità e fattori ambientali predisponenti (aumento dei valori della temperatura dell'acqua a causa del cambiamento climatico), possano assurgere al ruolo di patogeni emergenti causando una reale minaccia alla biodiversità degli ecosistemi acquatici di alta quota.

### Bibliografia

Roh, H., Kim, B.S., Lee, M.K., Park, C.I., Kim, D.H. (2020). Genome-wide comparison of *Carnobacterium maltaromaticum* derived from diseased fish harbouring important virulence-related genes. *Journal of Fish Diseases*, 43(9), 1029-1037.



## AN INTEGRATED APPROACH TO INVESTIGATE SPONTANEOUS LACTOCOCCOSIS IN FARMED RAINBOW TROUT (*ONCORHYNCHUS MYKISS*)

Khalil S.M.I.<sup>1,2</sup>, Saccà E.<sup>1</sup>, Galeotti M.<sup>1</sup>, Sciuto S.<sup>3</sup>, Colussi S.<sup>3</sup>, Pastorino P.<sup>3</sup>, Esposito G.<sup>3</sup>, Montemurro V.<sup>3</sup>, Pezzolato M.<sup>3</sup>, Volpatti D.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Agricultural, Food, Environmental and Animal Sciences (DI4A), University of Udine, Italy.

<sup>2</sup>Department of Fish Health Management, Sylhet Agricultural University, Bangladesh.

<sup>3</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Turin, Italy.

A multi-disciplinary study has been performed during an outbreak of lactococcosis due to *Lactococcus garvieae* in farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), including histology, classical and molecular-based bacteriology, blood analysis and serology, gene expression, specifically aiming at the comprehension of bacterial spreading within the fish body and the fish inflammatory reactivity against this harmful biological agent. A sampling was performed in an intensive Italian farm, including two groups of unvaccinated trout, sharing the same basin: asymptomatic (n=20, weight 242±71 g; length 30±3 cm) and symptomatic (n=20; weight: 245±95 g; length 30±4 cm). Blood/serum were collected to measure leukogram, lysozyme, peroxidase, antiprotease, bactericidal activity, total IgM, and total proteins, specific antibodies to *L. garvieae*. Head kidney, spleen, eye and brain were submitted to classical bacteriology. Spleen/head kidney were sampled for histological analysis, bacterial DNA detection, and gene expression (qPCR). Bacteria were found in blood smears of 8/20 (40%) symptomatic fish but not in asymptomatic fish. PCR revealed *L. garvieae* DNA in 18/20 (90%) symptomatic fish and in 2/20 (10%) asymptomatic fish. *L. garvieae* was always isolated from organs in clinically affected trout. Serum bactericidal and antiprotease activity, total proteins and total immunoglobulin (IgM) did not vary substantially between the groups ( $P \leq 0.05$ ). Symptomatic fish showed a higher peroxidase activity and a lower lysozyme activity compared to non-clinical fish ( $P \leq 0.05$ ). A significantly higher level of specific antibodies was recorded in asymptomatic fish compared to symptomatic, by agglutination and ELISA. Concerning gene expression, in both head kidney and spleen, *IL-8* showed very high significant up-regulation in symptomatic group compared to asymptomatic one ( $P < 0.001$ ) while *IgM* ( $P < 0.05$ ) and *MHC-II* ( $P < 0.01$ ) showed significant down-regulation in symptomatic compared to asymptomatic trout. *IgT* showed only a tendency ( $P < 0.1$ ) to be down-regulated in symptomatic trout compared to asymptomatic one, in spleen. No significant differences were observed for *IL-1 $\beta$* , *IL-6*, *IL-10*, *TNF- $\alpha$* , *TLR5*, *MHC-I* and *TCR- $\beta$*  in both organs. The histological analysis of both immune organs, currently in progress, will be subject of discussion in order to complete the description of host inflammatory reaction against the pathogen and to associate bio-molecular/immunological findings with the bacterial detection and the morphological alterations consequent to the infection.

## CASO DI FLAVOBATTERIOSI DA *FLAVOBACTERIUM PSYCHROPHILUM* IN STORIONE SIBERIANO (*ACIPENSER BAERI*)

Cortinovis L., Pretto T., Manfrin A.

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro (PD)*

Nell'aprile del 2023 si è verificato un episodio di mortalità in storione siberiano (*Acipenser baerii*) in un allevamento ittico situato nel Nord Italia. Il focolaio è stato caratterizzato da un basso tasso di mortalità associato a una sintomatologia aspecifica. Nell'impianto gli storioni sono allevati in vasche di cemento alimentate da acqua di fiume e vengono mantenuti in accrescimento dalla taglia di giovanili a quella di commercializzazione; oltre all'allevamento di questa specie ittica, l'allevatore si occupa della compravendita di trote iridee (*Oncorhynchus mykiss*) per cui anche questo salmonide è presente seppur non in maniera continuativa. In genere, l'allevamento è gestito come un sistema aperto a perdere senza interscambio tra le vasche di stabulazione; in caso di carenza idrica o di eventi che potrebbero compromettere la qualità dell'acqua in entrata, l'allevatore ha però la possibilità di passare al sistema a ricircolo. In quei momenti, l'acqua circola nelle vasche che ospitano trote e storioni senza alcuna disinfezione prima di passare tra le diverse vasche. Per motivi gestionali, il circuito è stato chiuso per alcuni giorni circa 10 giorni prima dell'inizio della mortalità.

Quattro storioni siberiani moribondi sono stati campionati e trasportati sotto ghiaccio al Centro Specialistico Ittico dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSVE) per l'esame necroscopico, batteriologico e istologico. All'esame esterno i soggetti presentavano marcata ipermucosità cutanea, emorragie periorali e presenza di lesioni necrotiche non ulcerate a carico della muscolatura scheletrica. All'esame interno una marcata splenomegalia è stata l'unica alterazione macroscopicamente apprezzabile. Per l'esame batteriologico sono stati campionati milza, rene, encefalo e muscolatura necrotica da tre dei quattro soggetti analizzati; tutti gli organi sono stati seminati in piastre di Agar Sangue (AS) poi incubate a 22°C; la muscolatura necrotica è stata inoltre seminata in piastre di Anacker-Ordal Enriched (AOAE) e mantenuta a 15°C. Per l'esame istologico sono state prelevate porzioni di cute e muscolo, cuore, rene, milza, encefalo, fegato e branchie.

Colture pure di *Flavobacterium psychrophilum* sono state ottenute dalla muscolatura necrotica, mentre negli altri organi campionati la crescita batterica è stata generalmente scarsa e tipica di un polimicrobismo, con la presenza di *Aeromonas sobria*, *Lactococcus piscium*, *Pseudomonas* sp. e *Rahnella aquatilis*. L'analisi istologica ha rivelato necrosi focale del derma e del tessuto muscolare con infiltrato infiammatorio e degenerazione del tessuto linfoide associato all'epicardio.

Ad oggi, questa è la prima segnalazione di isolamento di *Flavobacterium psychrophilum* in lesioni muscolari in storione siberiano in Italia. L'episodio descritto è probabilmente correlato all'impiego di un sistema a ricircolo con ha permesso un'esposizione prolungata degli storioni a *F. psychrophilum* veicolato da trota iridea, salmonide frequentemente interessato da questo patogeno.

## GASTRITE GRANULOMATOSA IN TROTA IRIDEA (*ONCORYNCHUS MYKISS*)

Beraldo P., Orioles M., Volpatti D., Galeotti M.

*Dipartimento di Scienze Agro-alimentari, Ambientali e Animali, Università degli Studi di Udine,*

Lo stomaco nei pesci mostra una elevata variabilità specie specifica in termini di dimensione, struttura e forma in relazione alla dieta. Caratteristiche comuni sono il notevole spessore della parete gastrica, soprattutto nella regione distale, la presenza di numerose pieghe che consentono una notevole distensibilità e la sua struttura anatomica, composta da una porzione cardiale, fundica e pilorica. Queste ultime due regioni hanno una funzione prevalentemente secretoria. La mucosa gastrica contiene ghiandole fundiche e piloriche, mentre la sottomucosa contiene numerose cellule granulari eosinofile oltre a vasi linfatici e ematici, e nervi. La fisiologia gastrica e il controllo della motilità sono complesse e generalmente paragonabili a quelle dei mammiferi terrestri. Nei teleostei, le alterazioni patologiche in sede gastrica sono poco descritte e per lo più causate da agenti infettivi, come virus (VHSV e IHNv causano alterazioni vascolari in sede gastrica), batteri e parassiti (infiammazioni granulomatose) ed anche miceti (gastriti micotiche). Anche nel contesto di studi nutrizionali, allorché l'istologia sia uno degli approcci investigativi adottati, la porzione gastrica dell'apparato digerente non è generalmente campionata ai fini valutativi, come invece fegato e intestino.

Negli ultimi anni, ricorrentemente in campioni di stomaco di trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*), provenienti da studi sperimentali di nutrizione o inviati ai fini diagnostici al Laboratorio di patologia veterinaria dell'Università degli Studi di Udine (DI4A), sono stati rilevati quadri infiammatori riferibili a gastrite granulomata (GG), un'entità rara (anche nei mammiferi), caratterizzata dalla presenza di granulomi all'interno della mucosa o della sottomucosa gastrica.

I campioni, prelevati da terzi e inviati al laboratorio, erano fissati in formaldeide tamponata al 4% e sono stati processati al fine di ottenere sezioni colorate con ematossilina-eosina per la valutazione/diagnosi istologica. Ulteriori colorazioni istochimiche (Von Kossa, PAS-Alcian blu, Zielh-Nielsen, Grocott e Gram) sono state effettuate a completamento della diagnosi morfologica ed eziologica.

I processi flogistici cronici della mucosa gastrica sono caratterizzati dalla diffusa presenza di granulomi di stadio avanzato o aggregati di macrofagi epitelioidi, ovvero cellule giganti multinucleate simili alle cellule di Langhans o del tipo da corpo estraneo. Le formazioni granulomatose sono state prevalentemente osservate nella sottomucosa, con minore frequenza nella *muscularis mucosae* e a livello della mucosa gastrica. Al centro dei granulomi o nelle cellule giganti si notano corpi inclusi, in parte ascrivibili a concrezioni calcio-proteiche (Von Kossa positivi) a struttura laminare o sferica; al contrario, non sono state osservate strutture riferibili a microrganismi (negatività per micobatteri, batteri e miceti). In taluni casi, l'infiammazione granulomata è stata anche osservata a livello del plesso mienterico e nella sierosa.

In via speculativa, l'eziologia della GG descritta potrebbe essere ricondotta a un passaggio transmurale di particelle/sostanze estranee; infatti, in alcuni casi è stato acclarato l'impiego inconsapevole di materie prime deteriorate per la produzione delle diete (come oli irranciditi) o di mangimi mal conservati. Altre speculazioni sull'eziologia di queste GG e le potenziali conseguenze sulle performance zootecniche saranno discusse in dettaglio durante la presentazione dei casi. In conclusione, tali osservazioni istopatologiche suggeriscono che lo stomaco dovrebbe essere incluso nelle valutazioni istologiche, soprattutto nell'ambito di studi nutrizionali e qualora la variabile sperimentale preveda di saggiare nuovi componenti/materie prime.

## INDAGINE PARASSITOLOGICA SU GRANCHIO BLU (*CALLINECTES SAPIDUS*) IN ALTO ADRIATICO

Gustinelli A.<sup>1</sup>, Are R.<sup>1</sup>, Caffara M.<sup>1</sup>, Tedesco P.<sup>1</sup>, Quaglio F.<sup>2</sup>, Fioravanti M.L.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento Scienze Mediche Veterinarie (DIMEVET), Alma Mater Studiorum Università di Bologna, Ozzano Emilia (BO);

<sup>2</sup>Dipartimento di Biomedicina Comparata e Alimentazione (BCA), Università di Padova, Legnaro (PD)

La traslocazione antropogenico-mediata delle specie animali e vegetali in regioni geografiche al di fuori del loro areale nativo è considerata una delle caratteristiche ecologiche più distintive dell'era antropocenica. Un mondo sempre più globalizzato e soggetto a cambiamenti ambientali ha portato ad una crescente diffusione di specie aliene con una riorganizzazione mondiale della distribuzione di molte specie animali e vegetali con crescenti impatti economici. Alcune di queste specie aliene si sono dimostrate anche invasive per la loro spiccata attitudine predatoria nei confronti delle specie indigene o la competizione alimentare nei loro confronti fino al ruolo come serbatoi di patogeni trasmissibili ad elevato impatto sanitario sulle popolazioni autoctone. Il granchio blu (*Callinectes sapidus*), segnalato per la prima volta nelle acque del Mediterraneo negli anni '30 solo recentemente e grazie ai cambiamenti climatici si è diffuso notevolmente diventando pressoché ubiquitario nelle acque costiere nazionali e rappresentando attualmente una delle specie aliene invasive più impattanti sulla biodiversità del nostro territorio. I dati relativi ai patogeni trasmissibili potenzialmente veicolati da questa specie, già ampiamente riportati per il continente americano, sono invece pressoché inesistenti per quanto riguarda il Mediterraneo. Alla luce di questa carenza di informazioni si è deciso di intraprendere una preliminare indagine parassitologica volta ad individuare i parassiti presenti nelle popolazioni di *C. sapidus* prelevati da alcune zone costiere di Emilia Romagna e Veneto (Punta Marina (RA), Marina Romea (RA), Codigoro (FE), Rosolina (RO) per iniziare a caratterizzare i parassiti in grado di avere un impatto sia in sanità animale che in sanità pubblica, quest'ultimo aspetto legato alla grande potenzialità che *C. sapidus* presenta dal punto di vista del consumo umano. L'indagine è stata improntata principalmente sulla ricerca di *Hematodinium* spp., protozoo di particolare interesse per quanto riguarda lo stato di salute delle popolazioni autoctone di crostacei in quanto potenzialmente capace di causare pesanti mortalità, e sulla ricerca di metacercarie di digenei di interesse ispettivo veterinario in quanto a potenziale carattere zoonotico. In totale sono stati campionati 41 esemplari di *C. sapidus*, 20 da Punta Marina, 11 da Marina Romea, 6 da Rosolina e 4 da Codigoro. I soggetti pescati sono stati immediatamente posti in un frigorifero portatile e il giorno seguente tutti gli esemplari sono stati sottoposti alle misurazioni biometriche e alle indagini parassitologiche ed istopatologiche: sono stati eseguiti il prelievo dell'emolinfa, l'esecuzione di uno striscio colorato con Hemacolor® per l'esame citologico, un esame microscopico a fresco delle branchie e, previa compressione, della muscolatura. Porzioni di organo sono state inoltre fissate in formalina tamponata al 10% per l'esecuzione dell'esame istologico.

L'esame microscopico a fresco e citologico degli strisci ha permesso di individuare in 6 esemplari di Punta Marina (RA) e 1 esemplare di Codigoro (FE) alcuni elementi cellulari riferibili a stadi ematici di *Hematodinium* spp., in concomitanza con un drastico calo della presenza di emociti, in similitudine con quanto descritto in letteratura. All'esame istologico delle branchie si è potuto evidenziare la presenza di alcuni quadri riconducibili ad infestazioni dal parassita in analogia con le descrizioni presenti in letteratura. La ricerca di metacercarie di trematodi digenei nella muscolatura di tutti gli esemplari esaminati ha avuto esito positivo in un unico granchio blu proveniente da Rosolina (RO) in cui sono state rilevate un totale di 55 metacercarie, tutte vitali e mobili, localizzate per la maggior parte (40) nella muscolatura delle chele e morfologicamente ascrivibili alla famiglia dei Microphallidae, di cui diverse specie - tutte prive di potenziale zoonotico - risultano già descritte in *C. sapidus*. In 3 individui inoltre sono state individuate formazioni cistiche contenenti spore di microsporidi, identificate mediante analisi molecolari come *Unikaryon panopei*, specie già descritta recentemente negli USA ma mai riportata nel Mediterraneo. Alla luce di questi risultati preliminari si rende necessario effettuare su un numero più esteso di individui approfondimenti diagnostici rivolti sia a parassiti che ad altri patogeni trasmissibili al fine di avere un quadro più completo dei rischi sanitari legati alla diffusione del granchio blu nei nostri ambienti costieri.

## PRIMA SEGNALEZIONE DI *PHILOMETROIDES SANGUINEUS* (NEMATODA: PHILOMETRIDAE) IN PESCI ROSSI (*CARASSIUS AURATUS*) ALLEVATI IN PIANURA PADANA

Pirollo T.<sup>1</sup>, Tedesco P.<sup>1</sup>, Cantori A.<sup>1</sup>, Caffara M.<sup>1</sup>, Tentoni E.<sup>2</sup>, Tarocchi L.<sup>2</sup>, Fioravanti M.L.<sup>1</sup>, Gustinelli A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie (DIMEVET), Alma Mater Studiorum Università di Bologna, Ozzano dell'Emilia (BO); <sup>2</sup>APA-CT s.r.l., Forlì

Il commercio e la produzione di specie ittiche a scopo ornamentale rappresenta un settore di notevole interesse economico a livello globale, portando i pesci d'acquario ad essere tra gli animali più traslocati al mondo. La diretta conseguenza di questi frequenti spostamenti è l'aumento del rischio di diffusione di agenti patogeni trasmissibili attraverso i loro ospiti ittici in areali geografici in cui non sono abitualmente presenti. Lo scopo del presente lavoro è descrivere per la prima volta in Italia un'infestazione da nematodi Philometridae in pesci rossi (*Carassius auratus*) allevati in Pianura Padana. Dopo alcune segnalazioni della presenza di una nuova malattia parassitaria dei pesci rossi ("vermi rossi nella coda") da parte di consulenti e di operatori del settore, è stato mandato al laboratorio di patologia ittica del DIMEVET un lotto di dieci pesci rossi (5 vivi e 5 morti) per analisi parassitologica. Tutti i pesci presentavano 1-3 elminti di colore rosso e 3-6 cm di lunghezza, mobili nello spessore delle membrane cutanee tra i raggi ossei della pinna caudale, alcuni dritti alcuni disposti a "U", con le estremità dirette verso il margine caudale della pinna. Dopo aver sedato i pesci tramite anestetico (MS-222), i vermi sono stati estratti con una leggera pressione e successivamente fissati in alcol 70% e in formalina tamponata al 10% per condurre analisi morfologiche e molecolari utili all'identificazione di specie. I pesci morti sono stati sottoposti ad un esame parassitologico completo.

Tutti i nematodi prelevati dalla pinna caudale risultavano essere femmine gravide replete di larve di primo stadio, mentre l'esame parassitologico completo ha permesso di isolare alcuni maschi adulti di nematodi dalla sierosa della vescica natatoria di due *C. auratus*.

Le analisi morfometriche e molecolari hanno permesso di identificare i nematodi in studio come *Philometroides sanguineus*, parassita già descritto in letteratura (Molnar et al., 2006) e riconosciuto come specifico del genere *Carassius*. La sua diffusione si estende dall'Europa orientale (Wierzbicki, 1960), agli USA (Moravec, 1994), alla Svezia e Regno Unito (Pegg et al. 2011). Ad oggi in Italia non risultavano segnalazioni della sua presenza.

Alla luce dell'elevato valore economico dell'allevamento dei pesci rossi nel Nord Italia, è urgente condurre indagini epidemiologiche per definire le modalità di ingresso e l'attuale distribuzione di questo parassita di recente introduzione e valutare i rischi di diffusione nelle popolazioni ittiche nazionali.

### Bibliografia

Molnar K., Buchmann K., Székely C. (2006). Chapter 12 - Phylum Nematoda. In: Fish Diseases and Disorders Vol. 1 (ed. P.T.K. Woo): 414-440.

Moravec F. (1994). Parasitic Nematodes of freshwater fishes in Europe. Kluwer Academic Publishers Dordrecht (NL): 291-296.

Pegg J., Williams C.F., Cucherousset J., Britton J.R. (2011). What are the consequences of infection by the introduced parasite *Philometroides sanguineus* for threatened crucian carp *Carassius carassius* populations in England? Ecology of Freshwater Fish, 20: 598-604.

Wierzbicki K. (1960). Philometrosis of crucian carp. Acta Parasitologica Polonica 8: 181-196.

## CASI CHIRURGICI TRATTATI CON LASERTERAPIA E DIAGNOSI MORFOLOGICA DI TRE NEOPLASIE CUTANEE IN CARASSI DORATI

Corradini C.<sup>1</sup>, Cocumelli C.<sup>1</sup>, Caldarelli F.<sup>2</sup>, Di Giamberardino F.<sup>1</sup>, Amiti S.<sup>1</sup>, Palmerini T.<sup>1</sup>, Gennari F.<sup>1</sup>, Bossù T.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana "M. Aleandri", Roma; <sup>2</sup>Medico Veterinario Libero Professionista ESOVET, Roma.

Nei pesci le neoplasie, ed in particolare i tumori cutanei, sono un reperto non frequente, e le informazioni riguardo la loro distribuzione e la loro caratterizzazione sono sporadiche in letteratura.

In tre diversi episodi, sono stati riferiti al Medico Veterinario tre pazienti di carassio dorato (*Carassius auratus*) stabulati in acquari domestici, nell'area metropolitana di Roma. In tutti i casi i soggetti erano in buone condizioni di salute generale, e le lesioni si presentavano come masse cutanee esofitiche focali. L'escissione chirurgica è stata effettuata in anestesia totale indotta attraverso immersione e mantenuta durante l'operazione attraverso perfusione delle branchie con soluzione di acqua e anestetico attraverso pompaggio nella cavità orale. La molecola utilizzata come anestetico è tricaina metansolfonato (PHARMAQ). Come trattamento analgesico è stata eseguita un'iniezione di lidocaina intramuscolare. Il dosaggio della tricaina è stato calibrato in base alla risposta specifica dell'esemplare, partendo da una concentrazione iniziale di 50 mg/l in acqua di immersione e aggiungendo anestetico lentamente in base alle reazioni comportamentali dell'animale di fronte a stimoli di manipolazione e alla frequenza opercolare. La terapia antidolorifica è stata effettuata tramite iniezione intramuscolare di lidocaina. L'erogazione di mantenimento è stata effettuata tramite l'utilizzo di una pompa capace di erogare 200 ml al minuto, riducendone la portata a circa la metà in un esemplare per via delle sue ridotte dimensioni (circa 100 g contro circa 250 degli altri due). Nell'acqua di stabulazione è stato utilizzato un aeratore in modo da ottimizzare lo scambio dei gas.

Le masse escisse sono state conservate in formalina 10% neutra tamponata e sottoposte ad indagini istopatologiche presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana.

Il primo esemplare presentava massa nodulare pedunculata di colore rosa-aranciato sul dorso di circa 20 mm. Istologicamente la proliferazione era non capsulata, a crescita infiltrativa, e costituita da cellule mesenchimali disposte a formare brevi fasci e palizzate, con pattern di crescita storiforme. Multifocalmente le cellule neoplastiche contenevano piccoli granuli da bruni a rosati nel citoplasma indirizzando la diagnosi morfologica verso il cromatoforoma. La diagnosi istologica è supportata dall'anamnesi: il pesce infatti aveva perso il tipico colore aranciato durante lo sviluppo della massa, e si presentava all'operazione di colore bianco argenteo, con l'eccezione della base della neoplasia. Dopo sei mesi non si registra recidiva, sebbene questa si sia presentata dopo 12 mesi circa dall'operazione.

Il secondo esemplare presenta una massa nodulare bianca in prossimità della narice sinistra di circa 3 mm, sottilmente capsulata, ben delimitata, a crescita espansiva, e formata da moderato numero di cellule mesenchimali disposte a formare lacune regolari, delimitate da un singolo strato di cellule interpretate come cellule endoteliali, sostenute da sottile stroma fibroso. Il quadro istologico è morfologicamente compatibile con emangioma cavernoso. Dopo sei mesi dall'operazione si registra recidiva nell'area di escissione.

Il terzo esemplare presentava una massa nodulare sessile bianca, formata da moderato numero di cellule mesenchimali disposte in brevi fasci disposti con pattern fascicolare e da abbondante stroma collagene, con cellule fusate indicative di tumore maligno dei tessuti molli, compatibile con fibrosarcoma. Dopo cinque mesi non si registra recidiva.

Sebbene ristretta, la casistica presentata indica la laserterapia come trattamento efficace per la rimozione di neoformazioni tegumentarie nei pesci, nonostante l'occorrenza di recidiva delle neoplasie. La variabilità delle lesioni riscontrate suggerisce la necessità di raccolta di un numero maggiore di casi, in collaborazione con i medici veterinari liberi professionisti, con l'obiettivo di estendere la caratterizzazione e la sistematizzazione delle neoplasie nei pesci ornamentali.

## **BENESSERE ALLA MACELLAZIONE DEI PESCI IN ITALIA: SITUAZIONE ATTUALE IN UN QUADRO NORMATIVO EUROPEO IN EVOLUZIONE**

Clemente G. A.<sup>1</sup>, Tolini C.<sup>1</sup>, Lorenzi V.<sup>2</sup>, Dal Lago T.<sup>3</sup>, Benedetti D.<sup>3</sup>, Bellucci F.<sup>3</sup>, Manfrin A.<sup>4</sup>, Trocino A.<sup>5</sup>, Rota Nodari S.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, via A. Bianchi 9, Brescia (BS); <sup>2</sup>Centro di referenza nazionale per il benessere animale, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, via A. Bianchi 9, Brescia (BS); <sup>3</sup>Ministero della Salute, Viale Giorgio Ribotta, 5, Roma (RM); <sup>4</sup>Centro di referenza nazionale per lo studio e la diagnosi delle malattie dei pesci, molluschi e crostacei, Istituto Sperimentale delle Venezie, Viale Università 10 - Legnaro (PD); <sup>5</sup>Università di Padova, Legnaro (PD).

Negli ultimi decenni si è assistito ad un incremento dell'interesse scientifico, politico e sociale per le pratiche utilizzate in acquacoltura e i relativi problemi legati al benessere animale. Nel 2020 la Commissione Europea con la strategia "Farm to Fork", ha intrapreso un percorso revisione della legislazione in materia del benessere degli animali allevati. Nello specifico, per la macellazione dei pesci, intende aggiungere maggiori indicazioni specie-specifiche per le principali specie allevate e rivedere alcuni criteri di valutazione del benessere. Ad oggi, in Italia, le informazioni relative alle procedure utilizzate per lo stordimento e la macellazione in acquacoltura sono insufficienti, sia per l'eterogeneità delle specie ittiche, sia per una generale carenza di dati rilevati sul campo. L'obiettivo di questo studio è stato quello di inquadrare le procedure messe in atto nel nostro paese per il benessere dei pesci di acquacoltura al momento della macellazione negli impianti dedicati a tale pratica e di metterle in relazione con le raccomandazioni e i pareri delle organizzazioni europee che si sono espresse sul tema. L'attività svolta per raggiungere questo obiettivo ha visto la collaborazione del CReNBA (Centro di Referenza Nazionale per il Benessere Animale) e del Ministero della Salute, tramite cui sono stati ottenuti i dati degli impianti di macellazione delle Regioni Veneto, Lombardia, Friuli Venezia Giulia, Puglia, Marche, Emilia Romagna e della Provincia autonoma di Bolzano. Il totale degli impianti valutati sono stati trentanove. La macellazione ha riguardato le trote, carpe, salmerini, storioni, anguille, coregoni, salmoni del Danubio, lucioperche, persici reali, persici spigole, persici trote, pesci gatto, orate, spigole e ombrine. Nel 61% degli impianti presi in considerazione si macella più di una specie e nell'85% si pratica solo un metodo di stordimento/macellazione. La maggior parte degli impianti (54%) ha riportato l'utilizzo della pratica dell'asfissia, seguita dal metodo elettrico-collettivo (41%). La valutazione dello stordimento si pratica nel 74% degli impianti. Di questi, la maggior parte svolge il controllo di più di un parametro e, tra quelli indicati, il parametro "respirazione" è stato quello più riportato seguito da "movimenti coordinati" e "risposta agli stimoli esterni". I risultati ottenuti hanno evidenziato numerose criticità in relazione alle raccomandazioni sia generiche sia specie-specifiche delle organizzazioni europee e internazionali (WOAH e EFSA), sia per quanto riguarda i metodi utilizzati per lo stordimento e la macellazione, sia per la valutazione della loro efficacia. È inoltre evidente come sia necessario aggiornare le raccomandazioni già presenti e colmare le lacune scientifiche sui metodi di stordimento per altre specie.

## LA PARTENOGENESI NEGLI ELASMOBRANCI: PRIMO CASO RIPORTATO DEL PALOMBO COMUNE *MUSTELUS MUSTELUS*

Esposito G.<sup>1</sup>, Pastorino P.<sup>1</sup>, Sciuto S.<sup>1</sup>, Meletiadiis A.<sup>1</sup>, Gagliardi F.<sup>2</sup>, Pira A.<sup>2</sup>, Corrias I.<sup>2</sup>, Acutis P.L.<sup>1</sup>, Bozzetta E.<sup>1</sup>, Dondo A.<sup>1</sup>, Prearo M.<sup>1</sup>, Colussi S.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Via Bologna, 148 - 10154 Torino, Italia; <sup>2</sup> Acquario di Cala Gonone, Via La Favorita snc - 08022 Cala Gonone, Dorgali (NU), Italia.

La partenogenesi, o “*virgin birth*”, è stata descritta in tutti i taxa di vertebrati, ad eccezione dei mammiferi. Alcune specie di vertebrati adottano una partenogenesi obbligata dovuta all'assenza di maschi nella popolazione (e.g., la lucertola del deserto *Cnemidophorus uniparens*). Tuttavia, in specie che di norma si riproducono per via sessuale si verifica eccezionalmente la ticopartenogenesi, in cui le femmine utilizzano la partenogenesi come mezzo per trasmettere i propri geni (Feldheim *et al.*, 2023). La maggior parte dei vertebrati, come i varanidi, gli elasmobranchi ed alcuni serpenti, attuano una partenogenesi di tipo facoltativo, modificando la propria strategia adattativa in funzione delle circostanze. Tuttavia, i fattori scatenanti la partenogenesi sono ancora poco chiari, ma si pensa che la mancanza di esemplari maschi possa giocare un ruolo importante.

La partenogenesi negli elasmobranchi è stata descritta in animali in cattività, data la difficoltà nel rilevare tale fenomeno nel contesto naturale (Feldheim *et al.*, 2010). Nello specifico, sono stati documentati casi di partenogenesi per specie vivipare come lo squalo martello *Sphyrna tiburo* nel 2001 presso l'Henry Doorly Zoo and Aquarium ad Omaha, Nebraska e nel 2007 per lo squalo pinna nera *Carcharhinus limbatus* presso il Virginia Aquarium & Marine Science Center di Virginia Beach, USA. Tuttavia, questo fenomeno riproduttivo è stato osservato anche in specie che presentavano una riproduzione di tipo oviparo. Un primo caso è stato documentato tra il 2002 ed il 2005 per lo squalo bambù *Chiloscyllium plagiosum* presso il Downtown Aquarium di Denver, USA; successivamente, nel 2008 per lo squalo zebra *Stegostoma tigrinum* presso il Burj Al Arab Aquarium in Dubai, Emirati Arabi Uniti, e nel 2017 per la stessa specie, in un acquario del Queensland in Australia.

Nel presente lavoro viene descritta per la prima volta e confermata geneticamente, mediante l'analisi di 13 loci microsatellite, l'adozione di questa strategia riproduttiva nello squalo palombo *Mustelus mustelus*, in esemplari in cattività presso l'Acquario di Cala Gonone a Dorgali (NU), in Sardegna. Si tratta di uno squalo appartenente alla famiglia dei Triakidae, viviparo e diffuso sia nell'Oceano Atlantico che nel Mar Mediterraneo a batimetriche comprese tra i -5 ed i -600 metri circa. Non pericoloso per l'uomo, può raggiungere la taglia massima di 2 metri ed eccezionalmente l'età di 24 anni. La specie è inoltre inserita nella lista rossa dell'*International Union for Conservation of Nature* (IUCN) in quanto a grave rischio di estinzione (in pericolo (EN) A3d) per via della pesca eccessiva di cui è stata fatta oggetto.

### Bibliografia

Feldheim K.A., Chapman D.D., Sweet D., Fitzpatrick S., Prodöhl P.A., Shivji M.S. & Snowden B. (2010). Shark virgin birth produces multiple, viable offspring. *J. Heredity*, 101(3): 374-377.  
 Feldheim K.A., Dubach J. & Watson L. (2023). Parthenogenesis in an elasmobranch in the presence of conspecific males. *J. Fish Biol.*, 102(2): 525-527.



## ISOLAMENTO E PRIMA CARATTERIZZAZIONE DI LINEE CELLULARI DI STORIONE RUSSO (*ACIPENSER GUELLENSTAEDTII*)

Lucon Xiccato R.<sup>1</sup>, Quartesan R.<sup>1</sup>, Toffan A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Istituto Zooprofilattico delle Venezie, Legnaro, Padova

L'allevamento di storioni rappresenta una parte economicamente rilevante per l'acquacoltura Europea. Una delle maggiori problematiche riscontrabili nell'allevamento di queste specie, è la diffusione di patologie emergenti a eziologia virale. In particolare, le malattie provocate da Iridovirus stanno acquisendo sempre maggiore rilevanza nel campo della storionicoltura.

Lo storione russo (*Acipenser gueldenstaedtii*) risulta essere la specie più suscettibile alle infezioni da *Acipenser Iridovirus European* (AcIV-E), la mancanza di una linea cellulare adeguata comporta al momento l'impossibilità di isolare tale agente virale, ponendo un ostacolo importante alla diagnosi e allo studio della malattia nonché alla caratterizzazione del virus.

Per tale motivo si è deciso di utilizzare lo storione russo per provare a ottenere delle colture cellulari da utilizzare per un eventuale isolamento virale.

Da 2 soggetti di storione russo di circa 15 cm, risultati negativi agli esami batteriologici e virologici, sono stati espianati, dopo soppressione con overdose di anestetico (MS222), diversi tessuti (branchie, cute, pinne, cervello, milza, fegato).

Circa 2-3 cm di tessuto sono stati dissezionati da pinna, cute e branchia. Il tessuto è stato disinfettato in etanolo al 70%, sciacquato in soluzione fisiologica sterile addizionata di circa 20 gocce di Amfotericina B ogni 20-30 mL e adagiato sul fondo di una flask da 25 cm<sup>2</sup> (Falcon® Primaria Cell Culture Flasks), lasciando aderire il tessuto per qualche ora. Quindi, sono stati aggiunti 5 mL di terreno di coltura iposmotico composto da Dulbecco's Modified Eagle Mem, addizionato con 1% antibiotico/antimicotico 100x, 20% siero bovino fetale scomplementato, soluzione di HEPES 20 millimolare, e 10-15 gocce di Amfotericina B ogni 100 mL. Le flask sono state incubate a 25°C, senza CO<sub>2</sub>, fino alla migrazione delle cellule dal tessuto.

Per cervello, milza, e fegato, il tessuto è stato dissezionato in modo sterile dall'animale e disinfettato come sopra, poi sminuzzato, e sottoposto a diversi cicli di tripsinizzazione con 3 ml di tripsina iposmotica per 3-5 minuti in agitazione. Il surnatante derivato è stato raccolto, centrifugato a 1500 rpm per 5 minuti e il pellet cellulare così ottenuto è stato risospeso nel medium descritto precedentemente e seminato in flask da 25 cm<sup>2</sup>.

Una volta raggiunta la confluenza (da 7 a 30 giorni a seconda del tessuto), le cellule sono state passate con un rapporto di moltiplicazione di 1:1 o 1:2, utilizzando per metà terreno fresco e per metà terreno esausto.

Di tutti i tessuti è stato possibile propagare solo pinne, cute e cervello. Le cellule originate da cute e pinne appaiono fibroblastiche, fusiformi e formano un monostrato compatto che si mantiene per diverse settimane. Sono caratterizzate da crescita lenta, vengono passate ogni 2-3 settimane e hanno raggiunto circa 30 passaggi. Le cellule originate dal cervello appaiono molto ramificate con una crescita "disordinata" che ricorda le connessioni nervose, vengono passate più frequentemente e hanno ormai raggiunto i 40 passaggi.

Tutte e tre le linee cellulari si mantengono vitali incubate sia a 25°C che a 20°C, sono state testate per la presenza di micoplasmi e sono risultate negative.

È stata anche effettuata con successo una prova di congelamento delle cellule primarie in azoto, che hanno mantenuto la loro vitalità anche in seguito allo scongelamento.

Ai primi tentativi di utilizzo per la diagnostica delle malattie virali degli storioni, le cellule di storione russo sono risultate suscettibili all'herpes virus degli storioni, mostrando effetto citopatico dopo l'infezione con omogenati d'organo infetti. Tali herpesvirus saranno oggetto di successive caratterizzazioni. Al contrario nessuna delle linee sembra essere suscettibile a infezione con AcIV-E, tuttavia i pochi casi clinici testati rendono necessari altri approfondimenti.

Ulteriori caratterizzazioni delle nuove linee cellulari, denominate rispettivamente AGB, AGS e AGF, ovvero *A. gueldenstaedtii* Brain, Skin e Fin, sono in corso.

## IMPIEGO DI eDNA NELLA RILEVAZIONE DI PATOGENI ACQUATICI

Pretto T., Paolini V., Cortinovis L., Basso A.

*Istituto Zooprofilattico delle Venezie, Legnaro, PD*

L'analisi del DNA ambientale (environmental DNA - eDNA) è diventata rapidamente una delle tecniche più versatili per valutare la presenza di organismi connessi spazialmente e temporalmente ad un determinato ambiente. Questo approccio viene con successo applicato sia per scopi di monitoraggio di specie in pericolo o di specie alloctone invasive sia per studi sulla diffusione di specifici agenti patogeni. Il DNA rilasciato da organismi dispersi nell'ambiente si trova libero, aderente a detriti, in frammenti cellulari, spore o cellule batteriche planctoniche. Tutte queste fonti di materiale genetico diluite in un campione ambientale, possono essere concentrate a partire da un volume di aria, acqua o suolo mediante metodiche di filtrazione.

Il successo dell'analisi dipende da molti fattori tra cui: la concentrazione del DNA target nel campione analizzato, la porosità del filtro impiegato e il volume filtrato, la sensibilità del metodo molecolare applicato, la presenza di contaminanti e/o inibitori. In particolar modo, questi ultimi possono pesantemente influire sulla qualità del DNA estratto e sulle successive analisi.

Per questo motivo studi metodologici sono necessari per sviluppare dei protocolli sperimentali specificamente adatti alla matrice da analizzare e alla specie di interesse da rilevare, ponendo particolare attenzione alle corrette tecniche di campionamento e ai metodi di conservazione dei campioni.

Si propongono alcuni esempi di applicazione dell'analisi dell'eDNA idonei alla rilevazione di due differenti patogeni: oomyceti (*Aphanomyces astaci*) e batteri (*Flavobacterium psychrophilum*).

**ABSTRACT**  
**Poster**

## VALUTAZIONE DELL'EFFETTO DI UN DISINFETTANTE SULLO STRESS OSSIDATIVO IN ZEBRAFISH (*DANIO RERIO*)

Abbà M.<sup>1,2</sup>, Tramuta C.<sup>1</sup>, Bondavalli F.<sup>1</sup>, Caldaroni B.<sup>3</sup>, Varello K.<sup>1</sup>, Esposito G.<sup>1</sup>, Montemurro V.<sup>1</sup>, Magara G.<sup>3</sup>, Pastorino P.<sup>1</sup>, Squadrone S.<sup>1</sup>, Abete M.C.<sup>1</sup>, Bozzetta E.<sup>1</sup>, Elia A.C.<sup>3</sup>, Prearo M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Istituto Zooprofilattico del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Via Bologna, 148 – 10154 Torino; <sup>2</sup>DBIOS, Università degli Studi di Torino, Via Accademia Albertina, 13 - 10123 Torino; <sup>3</sup>Dipartimento di Chimica, Biologia e Biotecnologie, Università degli Studi di Perugia, Via dell'Elce di sotto, 8 – 06123 Perugia.

I sistemi di acquacoltura intensivi, che rappresentano un importante settore in crescita, presentano alcune problematiche relative alla salute e al benessere animale che rendono necessario l'utilizzo di molecole in grado di limitare le infezioni di tipo batterico e protozoario. I disinfettanti impiegati possono però causare livelli di stress in grado di stimolare la generazione di specie reattive dell'ossigeno e l'alterazione dei sistemi antiossidanti degli organismi esposti. Si è quindi voluto valutare l'effetto di una sostanza disinfettante direttamente su pesci (zebrafish, *Danio rerio*). Le prove sperimentali sono state condotte utilizzando il prodotto commerciale Detarox<sup>®</sup> AP, più stabile e quindi facilmente valutabile nell'espressione dei suoi effetti rispetto ad altri prodotti a base di acido peracetico ed acqua ossigenata. Gli zebrafish sono stati per un periodo di 48 ore a due differenti concentrazioni di Detarox<sup>®</sup> AP: 1 ppm/l (gruppo A, n=27) e 10 ppm/l (gruppo B, n=27); un terzo gruppo (gruppo C, n=27) non trattato, è servito come controllo negativo. Le analisi relative agli enzimi dello stress ossidativo ed ai profili di espressione genica sono state effettuate ciascuna su pool di fegato, branchie e muscolo di tre soggetti per ogni gruppo. Per l'identificazione di biomarkers di stress ossidativo sono state testate le differenze nei livelli di attività enzimatica di SOD, CAT e GST nei tessuti. Per le analisi di espressione genica sono stati amplificati con PCR Real-Time tre geni indicatori di stress ossidativo (Cu/Zn-SOD, CAT, GST) e il gene di referenza  $\beta$ -actina. L'espressione relativa dei tre geni è stata calcolata utilizzando il metodo comparativo del ciclo soglia (Ct, *threshold cycle*). Gli esami istologico e immunoistochimico sono stati eseguiti su campioni tissutali fissati in formalina e inclusi in paraffina, preparati a partire da altri tre soggetti per ciascun gruppo. Le sezioni seriali di 4±2  $\mu$ m ricavate dai preparati sono state colorate con Ematossilina-Eosina (EE) per la valutazione morfologica dei campioni e utilizzate per l'esame immunoistochimico. Per quest'ultimo sono stati selezionati alcuni anticorpi utilizzabili sui preparati tissutali: GPX-1/2, Caspase 3, Catalase, HSP70 e SOD. La positività è stata valutata in cieco mediante metodo semiquantitativo attraverso l'assegnazione di un punteggio da 0 a 3 in base all'intensità e diffusione della positività di ogni organo analizzato. L'attività della SOD è risultata significativamente aumentata (100%) nelle branchie degli zebrafish del gruppo B, per cui è stato riscontrato anche un marcato decremento (fino al 90%) dei livelli di CAT e GST nel fegato. Nel muscolo l'attività di GST è diminuita (50%) anche nel gruppo A, in cui il disinfettante ha inoltre causato un aumento significativo dell'espressione dei tre geni correlati allo stress ossidativo nel fegato (Cu/Zn-SOD: 20,11; CAT: 2,58; GST: 2,75) e di due geni (Cu/Zn-SOD: 2,28; GST: 9,39) nelle branchie. Nel gruppo B sono aumentati significativamente i livelli di espressione genica nel fegato (GST: 2,1), nelle branchie (GST: 7,8) e nel muscolo (Cu/Zn-SOD: 2,36; GST:12). L'esame istologico non ha evidenziato lesioni patologiche significative in nessuno organo. L'andamento dell'espressione dei marker non presentava differenze significative tra i diversi tempi e concentrazioni. I dati ottenuti indicano che il disinfettante, anche a concentrazioni basse e dopo soli due giorni di esposizione, causa degli effetti sulla regolazione dei geni testati, che rappresentano i principali mediatori della risposta allo stress ossidativo coinvolti nella risposta antiossidante. Il decremento significativo dei livelli di CAT e GST nel fegato e nel muscolo degli esemplari esposti a 10 ppm suggerisce un marcato indebolimento della difesa antiossidante e del *pathway* della metabolizzazione degli xenobiotici. L'assenza di alterazioni istologiche e la limitata modificazione dei parametri immunoistochimici è spiegabile con il breve tempo di esposizione. L'effetto diretto di Detarox<sup>®</sup> AP sugli zebrafish si è quindi potuto rilevare precocemente alla concentrazione maggiore dal punto di vista molecolare ed enzimatico, mentre alla concentrazione minore solo a livello di espressione genica.

Ricerca effettuata con fondi del Ministero della Salute, Ricerca Corrente 16C14.

## MONITORAGGIO DELLO STATO DI SALUTE DELL’OSTRICA (*CRASSOSTREA GIGAS*) ALLEVATA IN SARDEGNA IN RELAZIONE AI PARAMETRI AMBIENTALI: STUDIO ISTOLOGICO E MOLECOLARE

Asara G.<sup>1,2</sup>, Antuofermo E.<sup>2</sup>, Polinas M.<sup>2</sup>, Sanna M.A.<sup>2</sup>, Alberti A.<sup>2</sup>, Murgia C.<sup>2</sup>, Melillo R.<sup>1</sup>, Burrai G.P.<sup>2</sup>, Ruiu A.<sup>1</sup>, Mandas D.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna, Struttura Complessa Diagnostica di Cagliari, Oristano e Sassari;

<sup>2</sup>Università degli Studi di Sassari, Dipartimento di Medicina Veterinaria

Negli ultimi anni, l’interesse crescente del mercato internazionale per il settore dei molluschi bivalvi ha portato ad un conseguente aumento dei controlli sanitari volti a monitorare lo stato di salute degli stessi. Nell’ostricoltura vengono descritti diversi agenti patogeni (*Vibrio spp.*, *Nocardia crassostreae*, *Ostreid Herpesvirus type-1*, *Marteilia spp.*, *Perkinsus spp.*) in grado di causare morie associate ad ingenti riduzioni delle produzioni. L’impiego di sistemi di produzione intensivi e le modificazioni indotte dai cambiamenti climatici sono, inoltre, responsabili di un sensibile incremento della sensibilità delle ostriche ai patogeni. L’obiettivo del presente lavoro è stato quello di determinarne lo stato di salute di ostriche concave (*Crassostrea gigas*) provenienti da diversi siti lagunari della Sardegna dedicati all’ostricoltura (Santa Gilla Nord, Santa Gilla Sud, laguna Feraxi-Muravera, laguna San Giovanni Muravera, Cooperativa Pescatori Tortoli, laguna S’Ena Arrubia).

I campionamenti sono stati eseguiti nei mesi di settembre-ottobre 2022 e di febbraio-marzo 2023, unitamente al rilevamento dei parametri ambientali (temperatura, salinità ed ossigeno). Sono state analizzate 130 ostriche mediante tecniche di biologia molecolare (PCR classica e real-time PCR) ed esame istologico. L’estrazione del DNA è stata effettuata da branchie e mantello per la ricerca di *Vibrio aestuarianus*, *Vibrio splendidus* ed *Ostreid Herpesvirus type-1*. Per l’esame istologico sono state eseguite sezioni trasversali dell’ostrica, fissate in formalina tamponata al 10% ed incluse in paraffina. Le sezioni sono state tagliate a 3 µm di spessore, colorate in ematossilina ed eosina ed osservate al microscopio ottico. La ricerca di *Vibrio aestuarianus* ha dato esito negativo in tutti i campioni esaminati. *Vibrio splendidus* è stato identificato in 1/130 campioni mentre *Ostreid Herpesvirus type-1* è stato osservato in 3/130 campioni. Le lesioni istologiche riscontrate sono state classificate in base alla tipologia della flogosi, della durata, della distribuzione e della gravità. Negli organi target, quali la ghiandola digestiva (98/130), le branchie (89/130) e il mantello (75/130) è stato osservato un multifocale/diffuso, da lieve a grave infiltrato infiammatorio di tipo emocitico. Le ostriche prelevate nel periodo di settembre-ottobre con temperatura dell’acqua più elevata ( $T \geq 27^{\circ}\text{C}$ ), salinità intorno a valori di 28 e 41 PSU, e ossigeno disciolto (DO%) compreso tra 4.14 e 8.4% hanno mostrato quadri infiammatori più rilevanti in termini di gravità e di distribuzione, rispetto ai campioni ottenuti in periodi con temperatura dell’acqua inferiore (febbraio-marzo) ( $P < 0.01$ ). Due esemplari del medesimo allevamento (Santa Gilla Sud) hanno mostrato una infiltrazione di emociti con evidenti segni di atipia e frequenti mitosi nel cuore, compatibile con una neoplasia maligna di origine emocitica finora raramente rinvenuta nella *Crassostrea gigas*. I risultati ottenuti rappresentano una prima indagine conoscitiva sullo stato di salute nell’ostrica concava allevata in Sardegna in assenza di episodi di mortalità, con particolare riferimento alla identificazione dei più comuni agenti patogeni e ai danni tissutali che possono determinare. Sono in corso ulteriori indagini finalizzate alla determinazione dell’impatto che tali agenti hanno sullo stato di salute dell’ostrica concava in relazione alle variazioni dei parametri ambientali.

## RILEVAZIONE AMBIENTALE DI *YERSINIA RUCKERI* IN TROTTICOLTURA: METODOLOGIE E RISULTATI PRELIMINARI

Bezzo Llufrío T.<sup>1,2</sup>, Schleicherova D.<sup>1,2</sup>, Abbà M.<sup>1,2</sup>, Pastorino P.<sup>1</sup>, Prearo M.<sup>1</sup>

Istituto Zooprofilattico del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Via Bologna, 148 - 10154 Torino, Italy; <sup>2</sup> DBIOS, Università degli Studi di Torino, Via Accademia Albertina, 13 - 10123 Torino, Italy.

*Yersinia ruckeri* è l'agente eziologico della Yersiniosi o Bocca rossa, una setticemia emorragica diffusa nei salmonidi di allevamento. Per molti anni comprendere i punti chiave dell'infezione da *Y. ruckeri* non è stata una priorità, grazie anche allo sviluppo tempestivo di un vaccino contro il biotipo 1 che è stato usato ampiamente negli allevamenti. Tuttavia, la graduale insorgenza della malattia in pesci vaccinati, riportata dal 2003, ha riaccessato l'interesse nel meccanismo di virulenza di questo patogeno. Nonostante negli ultimi anni un grande numero di studi abbia arricchito la conoscenza sul patogeno e la sua interazione con l'ospite, solo recentemente è stato determinato che tra le vie di infezione del batterio il principale punto di ingresso è dato dall'epitelio branchiale. Inoltre è altresì assodato che *Y. ruckeri*, come altri batteri come *Vibrio*, *Aeromonas* e *Flavobacterium*, riesce a sopravvivere e persistere in ambiente acquatico per diverso tempo, anche in assenza di ospiti o senza esprimere patogenicità. Questo studio si inserisce proprio in questo ambito, cercando di sviluppare una metodologia più affidabile di rilevazione di *Y. ruckeri* in matrici abiotiche. Per le finalità dello studio, sono state selezionate 4 trotticoltura intensive piemontesi, in cui si è effettuato un campionamento mensile nei mesi di aprile e maggio 2023 di acqua superficiale e sedimento, raccolti al fondo degli allevamenti stessi. Inoltre, nella stessa sessione di campionamento sono state prelevate 10 trote iridea (*Oncorhynchus mykiss*) per allevamento, da utilizzare come controllo, campionate in maniera casuale da vasche senza sintomatologia in corso. Da ogni allevamento nelle due sessioni di campionamento sono stati prelevati 5 litri di acqua che sono stati poi processati in laboratorio con tre metodologie diverse: 200 µL di acqua sono stati estratti con il kit di estrazione Extractme Genomic DNA Kit (EM13, Blirt); un litro di acqua è stato filtrato mediante una pompa a vuoto su filtro di nitrocellulosa (diametro 47 mm, porosità di 0,45 µm) ed il filtro è stato poi processato con lo stesso kit di estrazione sopra descritto; 40 ml di acqua tal quale è stata processata con il kit di concentrazione ed estrazione Wizard® Enviro Total Nucleic Acid Kit (Promega, Milano); ogni campione è stato processato con le tre metodiche in triplicato. Inoltre, da ogni campione di acqua prelevato è stato seminato su Agar sangue (AGS) 1 ml tal quale e dalle diluizioni in base 10 approntate appositamente per evidenziare la carica batterica e eventualmente la presenza di colonie singole. Dalle trote invece si è proceduto all'esame colturale da rene, occhio e cervello su terreni di primo isolamento (AGS e TSA). Tutte le colonie isolate, sia dall'esame delle acque che dalle trote sono state identificate mediante Maldi-tof. Dall'esame colturale diretto dell'acqua non si è evidenziata *Y. ruckeri*, mentre dalle trote sono state evidenziate positività parziali in 2 soli allevamenti in entrambi i campionamenti; più precisamente nell'allevamento B durante il campionamento di marzo si è osservata 1 trota positiva (1/10) mentre nel campionamento di aprile le positività sono aumentate (7/10); nell'allevamento D a marzo le positività sono state 3 (3/10), mentre ad aprile una soltanto (1/10); gli allevamenti A e C sono sempre risultati negativi. Tutte le colonie isolate e identificate come *Y. ruckeri* sono state estratte con il kit di estrazione in uso. Tutti gli estratti ottenuti dalle acque e dagli isolati batterici sono stati processati con PCR Endpoint utilizzando i primer Yer8 (5'-GCGAGGAGGAAGGGTTAAGTG-3') e Yer10 (5'-GAAGGCACCAAGGC-ATCTCTG-3'). Dalle analisi biomolecolari oltre alla conferma degli isolati batterici su trota, si è potuto osservare come con il primo metodo di estrazione, i campioni positivi sono risultati 5, mentre con le altre due metodiche tutti i campioni sono risultati positivi, anche negli allevamenti in cui non si è riscontrata alcuna positività sui pesci. Da questo studio preliminare si è evidenziato come la ricerca di patogeni in matrici abiotiche possa essere un metodo utile nella valutazione del rischio di insorgenza delle patologie e che tali metodiche possono essere utilizzate a scopo predittivo, affinando lo studio, per una migliore gestione delle attività imprenditoriali e delle operazioni di profilassi da mettere eventualmente in atto.

## **EPISODIO DI MORTALITA' ASSOCIATA AD INFEZIONE DA *AEROMONAS VERONII* BIOVAR *SOBRIA* IN SPIGOLE (*DICENTRARCHUS LABRAX*) ALLEVATE IN GABBIA IN ITALIA**

Bignami G.<sup>1</sup>, Quaglio F.<sup>2</sup>, Zanoni R.G.<sup>1</sup>, Fioravanti M.L.<sup>1</sup>, Gustinelli A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento Scienze Mediche Veterinarie (DIMEVET), Alma Mater Studiorum Università di Bologna, Ozzano Emilia (BO);

<sup>2</sup>Dipartimento di Biomedicina Comparata e Alimentazione (BCA), Università di Padova, Legnaro (PD)

*Aeromonas veronii* biovar *sobria* è un patogeno opportunista isolato da pesci dulciacquicoli, eurialini e marini che negli ultimi anni ha acquisito una crescente importanza a livello mondiale per l'industria dell'acquacoltura, inclusa la maricoltura mediterranea. In particolare questo patogeno è stato associato a focolai di malattia, talvolta caratterizzati da elevata mortalità, in spigole (*Dicentrarchus labrax*) allevate in Grecia (Smyrli et al., 2017), Turchia (Uzun e Ogut, 2015) e Italia (Florio et al., 2011; Susini et al., 2017) mentre altre specie ittiche (es. *Sparus aurata* ed altri sparidi) non sono risultate suscettibili all'infezione anche quando allevate in stretta contiguità con i lotti di spigole colpiti. Poiché in Italia i precedenti episodi di infezione da *A. veronii* bv. *sobria* nella spigola sono stati osservati in allevamenti a terra, descriviamo qui un episodio verificatosi in gabbie galleggianti durante il mese di settembre 2022 (temperatura dell'acqua intorno a 25 °C). I pesci colpiti (peso medio 141 g) apparivano letargici e con emorragie superficiali; la mortalità cumulativa registrata nell'arco di 3 settimane si è attestata a valori del 5,45%. Un lotto di 9 spigole è stato sottoposto ad esame necroscopico, parassitologico, batteriologico ed istologico secondo metodiche di laboratorio standard. All'esame anatomopatologico si osservavano lesioni emorragiche a livello cutaneo, congestione a livello di branchie ed encefalo, splenomegalia (in un caso con presenza di lesioni nodulari) e lesioni simil-ascessuali a livello epatico. L'esame parassitologico ha evidenziato *Diplectanum aequans* (Monogenea) a bassa intensità a livello branchiale e *Spaherospora dicentrarchi* (Myxozoa) a livello intestinale. L'esame colturale per batteri effettuato da cervello, rene e milza su Tryptone Soy Agar (TSA) addizionato con 1,5% di NaCl, Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose (TCBS) e Agar Sangue (AS) ha permesso di evidenziare in tutti i terreni, dopo 48 ore di incubazione a 25 °C, una crescita significativa di colonie ascrivibili ad un singolo morfotipo, positive al saccaroso su TCBS ed emolitiche su AS. Tutti gli isolati venivano identificati come *A. veronii* mediante MALDI-TOF MS (Bruker) con un elevato score (da 2.13 a 2.20), con conferma mediante PCR Multiplex (Persson et al., 2015); il sistema di identificazione API 20E (Biomerieux) ha mostrato per tutti gli isolati lo stesso profilo numerico (7207124) che, in accordo con Buller (2014), risultava riferibile ad *A. veronii* bv. *sobria* eccetto che per il test dell'indolo, negativo in tutti gli isolati come già evidenziato in letteratura per quanto concerne gli isolati da spigola. I valori di MIC hanno evidenziato un profilo di resistenza ad amoxicillina e ossitettraciclina per quanto concerne gli antibiotici autorizzati in acquacoltura. All'esame istologico si evidenziava complessivamente un quadro di infezione batterica sistemica; a livello branchiale si osservava edema focale, teleangectasie, congestione ed emorragie, necrosi e distacco dell'epitelio, flogosi focale con linfociti; il fegato presentava emorragie, necrosi e presenza di aggregati batterici; nella milza si evidenziavano piccole aree focali di necrosi; nel rene si osservavano emorragie interstiziali, necrosi glomerulare e degenerazione vacuolare dei tubuli con presenza di aggregati batterici nella milza; il cuore mostrava necrosi e pericardite focali con grave congestione del bulbo ed emorragie sottosierose; il muscolo scheletrico presentava ampie aree di necrosi e, nelle porzioni intorno al rene, necrosi e presenza di aggregati batterici con infiltrato infiammatorio. Era presente anche un'enterite batterica con necrosi e sfaldamento della mucosa con infiltrazione batterica nella sottomucosa. Alla luce dei cambiamenti climatici in atto l'aeromonosi da *A. veronii* bv. *sobria* può essere considerata una ulteriore minaccia sanitaria limitante lo sviluppo sostenibile della maricoltura mediterranea, con particolare riferimento alla spigola, anche per il profilo di elevata resistenza agli antibiotici spesso mostrata da questo patogeno opportunista.

Buller N.B., 2014, Bacteria and Fungi from Fish and Other Aquatic Animals. A practical identification manual. 2<sup>nd</sup> Edition, Cabi – Florio et al., 2011, Atti del XVII Convegno Nazionale SIPI, Ostuni (BR) - Persson et al., 2015, J. Clin. Microbiol., 53, 653–656 - Smyrli et al., 2017, Fish Pathol., 52, 68-81 - Susini et al. (2017). XXIII Convegno Nazionale SIPI, Lecce – Uzun & Ogut, 2015, Aquaculture, 437, 30-37.

## PRIMA SEGNALEZIONE DI *LACTOCOCCUS CARNOSUS* IN TROTA FARIO (*SALMO TRUTTA*)

Bondavalli F.<sup>1</sup>, Colussi S.<sup>1</sup>, Pastorino P.<sup>1,2</sup>, Esposito G.<sup>1,2</sup>, Abbà M.<sup>1,3</sup>, Bezzo Llufrío T.<sup>1,3</sup>, Acutis P.L.<sup>1</sup>, Prearo M.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Via Bologna, 148 – 10145 Torino, Italy; <sup>2</sup>Centro di Referenza Regionale per la Biodiversità degli ambienti acquatici, Via L. Maritano, 22 – 10051 Avigliana (TO), Italy; <sup>3</sup>DBIOS, Università degli Studi di Torino, Via Accademia Albertina, 13 – 10123 Torino, Italy.

*Lactococcus piscium* è una specie di cocco Gram positivo identificata per la prima volta come nuova specie nel 1990 negli Stati Uniti (Williams *et al.*, 1990) e mai più segnalata a livello ittico come causa di malattia. Si tratta di un germe psicrofilo, inserito tra i cocchi Gram positivi d'acqua fredda e che trova relativa rilevanza a livello biotecnologico in contrasto ad alcuni batteri patogeni negli alimenti come *Listeria monocytogenes* (Saraoui *et al.*, 2016).

In questo studio preliminare sono state analizzate presso il laboratorio di Ittiopatologia di Torino, 10 trote fario (*Salmo trutta*) provenienti da un allevamento pedemontano situato nel nord-ovest del Piemonte, per l'esecuzione di test diagnostici di routine nella verifica dello stato sanitario della partita. L'analisi anatomopatologica condotta con i classici metodi, non ha evidenziato nessuna lesione o alterazione del quadro normotipico; l'esame colturale, eseguito su terreni di primo isolamento (AGS e TSA) è stato eseguito direttamente da rene, occhio e cervello. Un campione all'esame colturale è risultato positivo, con crescita di colonie piccole e traslucide, in purezza, derivante da una semina dall'occhio; lo stesso soggetto non ha evidenziato crescita nelle semine da rene e cervello. Le colonie, clonate su AGS sono state inviate all'identificazione mediante Maldi-tof MS, previa caratterizzazione mediante la colorazione di Gram (Gram positive). Il ceppo è stato identificato come *Lactococcus piscium*. Per verifica è stato inviato per l'identificazione al Maldi-tof anche un ceppo di referenza di *L. piscium* (DSM 6634) con esito omologato.

A questo punto, visto l'importanza della possibile segnalazione si è proceduto all'identificazione molecolare basata su una PCR della regione 16S-23S rRNA ITS, utilizzando i primer 16S 5'-GCTGGATCACCTCCTT-3' e 23S 5'-GGTACTTAGATGTTTCAGTTCC-3' descritti da Kabadjova *et al.* (2002); con tale metodica l'identificazione corretta è stata *Lactococcus carnosus* (valore di identità BLAST 99,83%).

*L. carnosus* e *L. paracarnosus* sono specie nuove di recentemente descrizione (Hilgarth *et al.*, 2020), molto simili a *L. piscium*. In uno studio precedente venivano descritti gli effetti ceppo-dipendenti dei ceppi di *L. piscium* e il loro potenziale per l'esclusione competitiva di potenti deterioratori sulla carne confezionata in atmosfera modificata (Hilgarth *et al.*, 2018); alcuni ceppi precedentemente attribuiti come *L. piscium*, sulla base dell'identificazione del database Maldi-tof MS sono stati riattribuiti a *L. carnosus* e *L. paracarnosus* dopo la caratterizzazione tassonomica con un approccio polifasico comprendente analisi filogenetiche, genomiche, chemiotassonomiche e fenotipiche.

Questi risultati sono importanti per poter condurre ulteriori studi sui patogeni Gram positivi dei salmonidi, per valutare l'effettiva presenza di queste specie batteriche nelle popolazioni allevate e selvatiche e la frequenza con cui si isolano e per comprendere meglio il reale ruolo patogenetico svolto da *L. piscium* e *L. carnosus* e il loro coinvolgimento nelle malattie sostenute da cocchi gram positivi nei pesci.

### Bibliografia

- Hilgarth M., Nani M. & Vogel R.F. (2018). Assertiveness of meat-borne *Lactococcus piscium* strains and their potential for competitive exclusion of spoilage bacteria in situ and in vitro. *J. Appl. Microbiol.*, 124: 1243-1253.
- Hilgarth M., Werum V. & Vogel R.F. (2020). *Lactococcus carnosus* sp. nov. and *Lactococcus paracarnosus* sp. nov., two novel species isolated from modified-atmosphere packaged beef steaks. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 70 (11): 5832-5840.
- Kabadjova P., Dousset X., Le Cam V. & Prevost H. (2002). Differentiation of closely related *Carnobacterium* food isolates based on 16S-23S ribosomal DNA intergenic spacer region polymorphism. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68: 5358-5366.
- Saraoui T., Leroi F., Björkroth J. & Pilet M.F. (2016). *Lactococcus piscium*: a psychrotrophic lactic acid bacterium with bioprotective or spoilage activity in food - a review. *J. Appl. Microbiol.*, 121: 907-918.
- Williams A.M., Fryer J.L. & Collins M.D. (1990). *Lactococcus piscium* sp. nov. a new *Lactococcus* species from salmonid fish. *FEMS Microbiol. Lett.*, 68: 109-113.



## AGGIORNAMENTO SULLA PREVELENZA DI IRIDOVIRUS NEGLI ALLEVAMENTI DI STORIONI IN NORD ITALIA NEL TRIENNIO 2021-2023

Bondavalli F.<sup>1</sup>, Schleicherova D.<sup>1,2</sup>, Mugetti D.<sup>1</sup>, Pastorino P.<sup>1</sup>, Gabetti A.<sup>1,2</sup>, Maganza A.<sup>1,2</sup>, Arsieni P.<sup>1</sup>, Dondo A.<sup>1</sup>, Prearo M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Via Bologna, 148 – 10154 Torino, Italia; <sup>2</sup>DBIOS, Università degli Studi di Torino, Via Accademia Albertina, 13 – 10123 Torino, Italia.

La pesca dello storione è quasi scomparsa e la vendita di caviale da pesce pescato è ora vietata a causa dell'esaurimento delle popolazioni selvatiche. Per questo motivo il prodotto d'acquacoltura ha preso il posto rispetto al pescato: Italia e Francia rappresentano i maggiori produttori dell'Unione Europea. La principale minaccia per gli storioni d'allevamento attualmente è rappresentata dall'infezione da *Acipenser Iridovirus-European* (AcIV-E), che colpisce soprattutto gli avannotti e il novellame. In questo studio, 354 storioni provenienti da 6 allevamenti del Nord Italia, appartenenti a diverse specie del genere *Acipenser* (170 esemplari di storione russo, *A. gueldenstaedtii*; 50 esemplari di storione siberiano, *A. baerii*; 38 di storione stellato, *A. stellatus*; 24 di storione cobice, *A. naccarii*; 22 di storione bianco, *A. transmontanus*; 14 di sterleto, *A. ruthenus*) e alla specie *Huso huso* (26 esemplari di storione ladano) e di età non superiore ai 12 mesi, sono stati testati tra gennaio 2021 e aprile 2023. I pesci in esame sono stati soppressi con dose letale di anestetico tricaina metansolfonato (MS-222), secondo le normative vigenti. Su ogni esemplare sono stati effettuati controlli necroscopici, batteriologici, parassitologici e virologici per certificarne lo stato di salute. Per effettuare l'indagine virologica sono state prelevate porzioni di branchie, che rappresentano l'organo in cui si riscontra la maggiore concentrazione virale. Una volta ottenuto l'estratto con un kit di estrazione in uso presso il laboratorio, questo è stato sottoposto a una PCR-real time specifica per la proteina maggiore del capsido virale di AcIV-E, secondo il protocollo descritto da Bigarré *et al.* (2017). Dalle analisi molecolari sono risultati positivi 136 esemplari, pari al 38,42% del totale. Più precisamente dei 170 esemplari di storione russo sono risultati positivi 117 (117/170 pari al 68,82%); altre positività sono state riscontrate in 7 storioni cobice (7/24 pari al 29,17%), 2 sterletti (2/14 pari al 14,29%), 6 storioni siberiani (6/50 pari al 12%) e 4 storioni stellati (4/38 pari al 10,53%); tutti gli esemplari di storione bianco e storione ladano sono risultati negativi. Quasi tutti i pesci risultati positivi alla RT-PCR presentavano segni anatomopatologici molto evidenti a livello branchiale (ingrossamento apici lamellari ed emorragie lamellari) e splenomegalia. Escluso i campioni relativi alla specie *A. gueldenstaedtii*, che risulta quella maggiormente campionata ed analizzata in questo studio e che rappresenta sicuramente una specie altamente suscettibile al virus e quelli di storione cobice dove vi sono positività minori, ma sempre con un valore vicino al 30%, non sono state riscontrate differenze molto evidenti nel numero di soggetti positivi delle altre diverse specie, risultati che si attestano tra il 10% e il 15% circa dei pesci campionati. È stato possibile, inoltre, evidenziare una differenza statisticamente significativa tra le infezioni nelle diverse stagioni dell'anno; infatti, nei mesi invernali il tasso di positività supera il 57% dei pesci campionati, mentre si attesta al di sotto del 37% negli altri mesi dell'anno. Resta da ricordare come sia largamente distribuita l'infezione da questo virus nel gruppo degli Acipenseridi allevati, dove si evidenzia una differente sensibilità al virus in differenti specie già segnalate dalla letteratura scientifica (Bigarré *et al.*, 2017; Mugetti *et al.*, 2020). Pertanto, questo tipo di allevamento è diventato sempre più importante nel corso degli anni e per tale motivo è estremamente importante monitorare costantemente i lotti ed i riproduttori in arrivo, così come i lotti già presenti in azienda, per prevenire l'introduzione del virus ed evitare perdite in un settore così rilevante per l'economia dell'acquacoltura nazionale.

### Bibliografia

Bigarré L., Lesne M., Lautretra A., Chesneau V., Leroux A., Jamin M., Boitard P.M., Toffan A., Prearo M., Labrut S. & Daniel P. (2017). Molecular identification of iridoviruses infecting various sturgeon species in Europe. *J. Fish Dis.*, 40(1): 105-118.

Mugetti D., Pastorino P., Menconi V., Messina M., Masoero L., Ceresa L., Pedron C. & Prearo M. (2020). Two new sturgeon species are susceptible to *Acipenser Iridovirus European* (AcIV-E) infection. *Pathogens*, 9: 156.

## PRIMA SEGNALEZIONE DI *LACTOCOCCUS PETAURI* IN PERSICO SOLE (*LEPOMIS GIBBOSUS*) SUL TERRITORIO ITALIANO

Bondavalli F.<sup>1</sup>, Colussi S.<sup>1</sup>, Pastorino P.<sup>1,2</sup>, Esposito G.<sup>1,2</sup>, Bezzo Llufrío T.<sup>1,3</sup>, Zanolí A.<sup>1,3</sup>, Acutis P.L.<sup>1</sup>, Prearo M.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Via Bologna, 148 – 10145 Torino, Italy; <sup>2</sup>Centro di Referenza Regionale per la Biodiversità degli ambienti acquatici, Via L. Maritano, 22 – 10051 Avigliana (TO), Italy;

<sup>3</sup>DBIOS, Università degli Studi di Torino, Via Accademia Albertina, 13 – 10123 Torino, Italy.

*Lactococcus petauri* è stato identificato come nuova specie nel 2017, distinguendolo da *Lactococcus garvieae*. Nel 2022 viene isolato come agente responsabile di un focolaio di lattococcosi in Turchia e l'identificazione viene effettuata tramite NGS per la difficoltà di distinguere le due specie. Da allora è stato isolato in diversi focolai in varie zone del bacino del Mediterraneo (Grecia, Turchia e Spagna), laddove prima i diversi focolai venivano attribuiti *in toto* a *L. garvieae*. Nonostante ciò, tale patogeno ittico non era mai stato identificato in Italia, in quanto da tutte le analisi condotte negli ultimi anni, tutti i ceppi isolati negli allevamenti italiani, compresa un'analisi retrospettiva dei ceppi presenti nelle cepptecche a disposizione, hanno dato sempre come responso unico *L. garvieae*.

La distinzione delle due specie è complessa, in quanto i più comuni metodi di identificazione microbiologica, ossia quella spettrofotometrica (Maldi-tof) e quella biochimica (API System, BioMérieux) non sono in grado di discernere tra le due specie. La distinzione è possibile solo tramite sequenziamento del tratto ITS dell'rRNA 16s-23s, come proposto da Stoppani *et al.* (2023) o dal sequenziamento dell'intero genoma batterico.

Durante un campionamento avvenuto nell'estate 2022 nelle acque del Lago di Candia (Piemonte, Italia), sono stati pescati alcuni esemplari di persico sole (*Lepomis gibbosus*). I pesci sono stati sottoposti ad esame anatomopatologico, parassitologico e culturale di primo isolamento da rene, occhio e cervello. Dall'esame culturale effettuato dall'occhio di uno dei pesci in esame è stato isolato un cocco Gram-positivo che è stato poi identificato tramite Maldi-tof. L'analisi spettrofotometrica ha dato come risultato *Lactococcus garvieae*. Visto l'isolamento insolito, sia per l'areale (presente in un'area in cui la lattococcosi non è mai stata segnalata), sia per l'ambiente lacustre in cui è stato effettuato, sia per la mancanza di sintomatologia nel soggetto da cui è avvenuto l'isolamento, sia per la specie ittica, si è pensato di approfondire la conoscenza del ceppo isolato mediante analisi biomolecolari per valutare i geni di patogenicità. Inoltre, dal ceppo isolato è stata valutata la sensibilità agli antibiotici mediante diffusione in agar (Kirby-Bauer), testando un panel predeterminato di antibiotici utilizzati nella routine per i germi Gram positivi (amoxicillina, ampicillina, enrofloxacin, eritromicina, florfenicolo, gentamicina, kanamicina, ossitettraciclina, penicillina G, spiramicina, streptomycin, tetraciclina e tiamfenicolo).

Con le ricerche biomolecolari si è iniziato innanzitutto con il protocollo definito da Stoppani *et al.* (2023) per la verifica di specie; i risultati ottenuti sono stati incontrovertibili ed hanno permesso di identificare la specie *L. petauri*. Sono tutt'ora in corso le analisi per verificare i geni di patogenicità.

Al fine di ottenere una caratterizzazione biochimica del ceppo isolato sono state effettuate a posteriori anche analisi biochimiche (API 20 Strep e Rapid ID 32 Strep, BioMérieux) che non hanno però evidenziato variabilità di profilo dagli isolati di *L. garvieae*. Per quanto riguarda la sensibilità agli antibiotici, il ceppo in considerazione ha rilevato una sensibilità piena ai  $\beta$ -lattamici, una sensibilità intermedia verso l'enrofloxacin, ma una totale resistenza alle restanti molecole.

L'isolamento di *Lactococcus petauri* sul territorio italiano costituisce un importante tassello all'interno del quadro di diffusione di questo patogeno a livello mediterraneo. Nonostante non sia ancora stato individuato come agente eziologico in focolai di lattococcosi occorsi in Italia, è lecito sostenere che tale patogeno, al momento attuale rinvenuto in un pesce selvatico, possa con facilità raggiungere le trottocolture. Si ravvede, quindi, la necessità di disporre di una mappatura della diffusione di *L. petauri* sul territorio nazionale, in modo da poter prevedere eventuali focolai epidemici correlabili a tale patogeno e programmare eventuali misure di biosicurezza e di profilassi idonee.

Bibliografia: Stoppani N., Colussi S., Pastorino P., Prearo M., Sciuto S., Altinok I., Öztürk R.C., Ture M., Vela A.I., Blanco M.d.M., Kotzamanidis C., Bitchava K., Malousi A., Fariano L., Volpatti D., Acutis P.L. & Fernández-Garayzabal J.F. (2023). 16S-23S rRNA Internal Transcribed Spacer Region (ITS) sequencing: a potential molecular diagnostic tool for differentiating *Lactococcus garvieae* and *Lactococcus petauri*. *Microorganisms*, 11: 1320.

## **INTERVENTI A SUPPORTO DELLO SVILUPPO AVANZATO, INTEGRATO E SOSTENIBILE DELL'ACQUACOLTURA**

Capparucci F., Iaria C., Natale S., Lanteri G., Marino F.

*Dipartimento di Scienze Chimiche, Biologiche, Farmaceutiche e Ambientali, Università degli Studi di Messina*

Il progetto INSAIL, interventi a supporto dello sviluppo avanzato, integrato e sostenibile dell'acquacoltura, nasce dalla richiesta di innovazione (di prodotto, di processo, di servizio) di aziende di acquacoltura marina, ha l'obiettivo generale di superare alcuni dei principali limiti tecnologici e biologici che bloccano il settore e contribuire all'aumento della sua competitività a livello nazionale ed internazionale e la sua sostenibilità ambientale. L'Università degli Studi di Messina in qualità di partner scientifico, con responsabile il Prof. Fabio Marino, effettuerà due attività di ricerca nell'ambito del progetto. Individuazione di nuove molecole di sintesi con proprietà antibiotiche tramite Z-FET (ZebraFish Embryo Toxicity) test, studio della risposta immunitaria di *Dicentrarchus labrax* a seguito di infezione sperimentale di Betanodavirus e selezione degli stock resistenti.

A tal fine sono state selezionate 20 nuove molecole di sintesi che verranno studiate sul modello zebrafish a differenti concentrazioni tramite test di tossicità acuta, valutazione morfologica di lesioni indotte e analisi post-mortali istologiche e molecolari. Dai primi studi, in particolare, una molecola di antibiotico ha indotto nelle larve di zebrafish alle 96hpf, un danno significativo a livello cardiovascolare individuato come edema del pericardio. Dai primi risultati preliminari ottenuti dagli antibiotici testati mediante indagini *in vitro* ed *in vivo*, non è stata riscontrata tossicità acuta. Pertanto, questi antibiotici di sintesi, a seguito di ulteriori ed approfonditi studi, possono rappresentare un punto di partenza per un futuro utilizzo negli impianti di acquacoltura.

In questo contributo vengono riportati i risultati preliminari dei primi test condotti. Nell'ambito dello studio inerente alla VNN (Viral Nervous Necrosis), esemplari di *D. labrax* appartenenti a diverse famiglie, saranno reperiti da impianti di maricoltura siciliani e infettati sperimentalmente con Betanodavirus. Per l'isolamento del ceppo di VER, si preleveranno sterilmente i cervelli di pesci sintomatici e singolarmente sottoposti ad omogeneizzazione. L'omogenato sarà quindi inoculato in monostrati di cellule SSN-1 coltivati in E-MEM (Sigma) addizionato con il 10% di siero fetale bovino (FBS), L-glutamina (1%), antibiotici e antimicotici (1%). I monostrati saranno osservati ogni giorno al microscopio ottico per l'individuazione dell'eventuale effetto citopatico. Il titolo virale sarà calcolato con il metodo statistico di Sperman-Karber. Per il test di immunofluorescenza saranno utilizzati monostrati di SSN-1 sviluppati su vetrini copri-oggetto in piastre di Petri. Ogni campione sarà inoculato con estratto di SNC su tre vetrini al fine di valutare la presenza del virus a 48, 72, e 96 ore p.i. impiegando siero policlonale antinodavirus e siero anti-coniglio coniugato con fluoresceina (Sigma). Da un pool di soggetti, dopo l'esame macroscopico, saranno prelevati campioni di cervello di seguito fissati in formalina al 10% e processati per l'inclusione in paraffina. Per lo studio della risposta immunitaria gli esemplari verranno sacrificati ad intervalli di tempo regolari ed a seguito di esame autoptico verranno campionati gli organi bersaglio per esami istologici e per le analisi molecolari

## TEST IN VITRO DI FAGOCITOSI IN CELLULE IMMUNITARIE DEL BIVALVE A RISCHIO DI ESTINZIONE PINNA NOBILIS

Carella F.<sup>1</sup>, Prado P.<sup>2,3</sup>, García-March J.R.<sup>3</sup>, Tena-Medialdea J.<sup>3</sup>, Cortés Melendreras E.<sup>4</sup>, Giménez Casalduero F.<sup>5,6</sup>, Feola A.<sup>1</sup>, Porcellini A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Biology, University of Naples Federico II, Via Cinthia Complesso di Monte Sant Angelo, Naples, Italy; <sup>2</sup>IRTA-La Ràpita. Ctra. Poble Nou Km 5.5, 43540 Tarragona, Spain; <sup>3</sup>IMEDMAR-UCV Instituto de Investigación en Medio Ambiente y Ciencia Marina, Universidad Católica de Valencia, 03710 Calpe, Alicante, Spain; <sup>4</sup>Murcia University Aquarium, University of Murcia, 30002 Murcia; <sup>5</sup>CIMAR, University of Alicante, 03690 Alicante, Spain; <sup>6</sup>Department of Marine Science and Applied Biology, University of Alicante, 03690 Alicante, Spain

A partire dal 2016 eventi di mortalità di massa (MMEs) sono stati riportati nel mollusco bivalve endemico del mediterraneo *Pinna nobilis*. Ad oggi, circa il 98% della popolazione risulta scomparsa in mare aperto e solo poche popolazioni residue sono presenti solo in baie e lagune costiere. Gli eventi di mortalità sono presumibilmente dovuti alla cooperazione di agenti biologici di natura parassitaria e batterica associata a fattori ambientali, a suggerire una potenziale ridotta capacità degli animali di rispondere attivamente agli stimoli patogeni. In questo lavoro è stata valutata la capacità di fagocitosi delle cellule immunitarie di *Pinna nobilis* in popolazioni naturali e in mantenute in cattività, nel contesto del progetto LIFE PINNARCA (LIFE20-NAT/ES/001265). Lo studio è stato condotto nel Luglio 2021 e nel Maggio 2022 in due popolazioni naturali della Baia di Alfacs (Catalogna, Spagna) e in animali mantenuti in cattività presso l'istituto IMEDMAR-UCV e l'Acquario di Murcia. Campioni di emolinfa sono stati prelevati con campionamenti non distruttivi: dopo la procedura, gli animali sono stati nuovamente posti nel substrato marino o in vasca e monitorati nei giorni successivi al prelievo. Per ogni individuo, è stata valutato il numero totale di cellule per millilitro di emolinfa (THC); le cellule emocitarie sono state incubate con bio-particelle PH rodo green (Invitrogen) coniugate con *Staphylococcus aureus* e *Zymosano A* e mantenute per 30 min e 3 h a 25°C. Dopo la stimolazione, le cellule sono state analizzate al citofluorimetro (FACScalibus Becton Dickinson) ed è stata valuta la percentuale di cellule capace di effettuare fagocitosi, misurata come intensità di fluorescenza media (MFI), accanto all'efficienza di fusione del sistema fago lisosomiale. I risultati mostrano che gli animali in cattività presentano un THC significativamente più basso rispetto alle popolazioni selvatiche (numero medio di 7-9 x 10<sup>4</sup> vs 2-5 x 10<sup>5</sup> cellule/mL, rispettivamente) sebbene con marcate variazioni tra gli individui. Nelle popolazioni selvatiche di maggio 2022, l'MFI ha mostrato valori bassi per entrambi gli stimoli (10-30%) dopo 30 minuti di incubazione e ha raggiunto il 30-50% dopo 3 ore. Nel luglio 2021, ad Alfacs, le cellule hanno mostrato un aumento dell'attività fagocitaria raggiungendo il 70% dopo 3 ore in un solo individuo mentre negli altri è rimasto intorno al 50%. In entrambe le stagioni gli animali in cattività presentavano scarsa o assente capacità fagocitica. Il test di correlazione di Pearson dei valori di THC e MFI è risultata positiva e forte (p-value =0,7) in tutte le condizioni sperimentali. Questo rappresenta il primo studio in vitro su emociti di *P. nobilis* durante gli MME. I nostri risultati rivelano una forte immunodepressione degli animali in cattività e una scarsa capacità della popolazione naturale di rispondere agli stimoli patogeni. Condizioni fisiopatologiche correlate allo stato riproduttivo e nutrizionale e stati di malattia possono influenzare l'abbondanza di emociti, determinando una profonda emocitopenia. La mortalità osservata e il declino della capacità immunitaria possono mettere nuova luce sull'immunocompetenza di questi animali.

## STUDIO PRELIMINARE DELLA PERKINSOSI (*P. OLSENI*) NEL MITILO MEDITERRANEO (*M. GALLOPROVINCIALIS*) NELLA REGIONE CAMPANIA

Carella F.<sup>1</sup>, Villari G.<sup>1</sup>, Paduano G.<sup>2</sup>, Lucibelli M.G.<sup>2</sup>, D'Angelo L.<sup>2</sup>, Di Iecce E.<sup>1</sup>, Di Nocera F.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Biologia, università degli studi di Napoli Federico II, Via Cinthia, Complesso di MSA, Napoli, Italia; <sup>2</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno, Portici, Italia

Patogeni del genere *Perkinsus* sono riportati in diverse specie di molluschi bivalvi, responsabili di episodi di mortalità principalmente nel gruppo di veneridi e ostreidi in diverse parti del mondo. Recentemente, sono aumentate le descrizioni di tali dinoflagellati nei mitili, ma poco si conosce sulla loro patogenicità e provenienza geografica.

In seguito alla prima descrizione di *Perkinsus olseni* in allevamenti e banchi naturali nel bivalve *Mytilus galloprovincialis* nella Regione Campania nel 2019, è stato effettuato un monitoraggio su 11 allevamenti dalla zona Nord a Sud della regione, da Ottobre 2022 a Marzo 2023. Per tale studio è stata effettuata diagnostica molecolare della regione ITS dell'rDNA (ITS1, 5.8S e ITS2) seguita da analisi delle sequenze dei campioni risultati positivi. Inoltre, a partire dal suo primo ritrovamento, è stato condotto uno studio sistematico stagionale su uno degli impianti risultati infetti, allo scopo di definirne la prevalenza e l'effetto sulle popolazioni di mitili nel tempo. L'esame istopatologico di tali campioni ha rilevato lesioni di natura infiammatoria rappresentata da numerose capsule emocitarie a livello di ghiandola digerente e gonade. Allo scopo di associare la risposta dell'ospite *M. galloprovincialis* alla presenza del parassita, sono state quindi isolate e caratterizzate diverse tipologie di lectine, identificandone alcune con funzione immunitaria già nota (Lectine tipo C e Galectine) e altre dalla funzione ancora poco definita (Mitilectine). Utilizzando tali geni, è stato effettuato uno studio di espressione genica in campioni sani e in campioni affetti da perkinsosi che presentavano lesioni infiammatorie di diversa intensità.

I primi risultati mostrano una prevalenza del 63% di *P. olseni* sul territorio, con 7 impianti di mitilicoltura risultati positivi degli 11 monitorati. Inoltre, i primi risultati degli studi immunologici evidenziano un potenziale coinvolgimento nell'interazione ospite-patogeno di alcune delle lectine isolate.

L'intensificazione degli allevamenti e i cambiamenti delle condizioni ambientali potrebbero favorire la progressione della malattia. Ulteriori studi sono necessari considerando l'elevato valore economico dei mitili per il settore dell'acquacoltura locale.

## ISOLAMENTO DI GAMMAPROTEOBATTERI IN SPECIE ABISSALI: RISULTATI PRELIMINARI

Colussi S.<sup>1</sup>, Pastorino P.<sup>1</sup>, Maganza A.<sup>1,2</sup>, Gabetti A.<sup>1,2</sup>, Marongiu C.<sup>3</sup>, Bondavalli F.<sup>1</sup>, Dondo A.<sup>1</sup>, Acutis P.L.<sup>1</sup>, Prearo M.<sup>1</sup>, Esposito G.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Via Bologna 148 - 10154 Torino, Italia; <sup>2</sup>DBIOS, Università degli Studi di Torino, Via Accademia Albertina, 13 - 10123 Torino, Italia; <sup>3</sup>Pescatore libero professionista, Dorgali (NU), Italia.

Nel 2022, a largo delle coste orientali della Sardegna (Mar Tirreno), sono stati campionati 37 esemplari tra selaci e teleostei ad una batimetria compresa tra i 250 e 350 m. Si tratta di organismi catturati accidentalmente (*by-catch*) durante una normale attività di pesca con reti da posta. Le specie oggetto dello studio erano il pesce sorcio o celorinco *Coelorinchus caelorhincus* (n=15; 23,80 ± 5,48 cm), il pesce specchio *Hoplostethus mediterraneus* (n=7; 18,32 ± 4,16 cm), il gattuccio boccanera *Galeus melastomus* (n=10; 51,50 ± 7,63 cm) ed il gattuccio *Scyliorhinus canicula* (n=5; 50,50 ± 6,24 cm).

Su tutti gli esemplari è stato condotto un esame anatomopatologico ed un esame parassitologico completo. Inoltre, sono stati effettuati prelievi batteriologici, mediante anse sterili, direttamente da rene, occhio e cervello, seminando su piastre di Columbia Blood Agar e su TSA salato (2% di NaCl). In aggiunta, per ogni isolato è stato eseguito un antibiogramma su Müller-Hinton, testando un *panel* predefinito di molecole.

Tutti gli isolati sono stati analizzati mediante MALDI-TOF e la maggior parte (61%) è risultata riconducibile a batteri Gram negativi appartenenti al genere *Psychrobacter*; un isolato è risultato invece Gram + ed appartenente al genere *Alkalihalobacillus*. Nel 36% dei casi, la metodologia utilizzata non ha consentito di pervenire ad una identificazione certa degli isolati, pertanto, si è proceduto ad una identificazione mediante metodiche di biologia molecolare. In particolare, è stato analizzato il gene 16S rRNA utilizzando i *primer* ed il protocollo di Demarta *et al.* (1999). L'analisi delle sequenze ottenute, effettuata con BLAST, ha consentito di attribuire gli isolati a specie diverse del genere *Psychrobacter* con un elevato valore di similarità (BLAST *identity value* 99,46-100%).

L'analisi filogenetica del gene 16S è stata utilizzata al fine di contribuire ad una chiara identificazione a livello di specie, soprattutto nei casi identificati con la stessa percentuale di similarità per due specie differenti. L'albero è stato costruito con il metodo *neighbor-joining* e un'analisi di bootstrap di 1.000 repliche, utilizzando il *software* Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGAX). Inoltre, gli antibiogrammi hanno messo in evidenza un'elevata suscettibilità dei ceppi testati, attribuibile alla scarsa antropizzazione dell'ambiente di pesca alle batimetrie descritte; casi di resistenza sono stati invece riportati per Ampicillina, Ossitetraciclina e Tetraciclina.

I Gammaproteobatteri sono stati riportati, da altri autori, come popolazione microbica prevalente a livello del sedimento prelevato a grandi profondità del Mar Tirreno (Ettoumi *et al.*, 2010); inoltre, sono stati rilevati dall'analisi del microbioma intestinale di specie ittiche abissali (Collins *et al.*, 2021). Il significato biologico della presenza di *Psychrobacter* a livello di distretti differenti, quali neurologico (occhio e cervello) e renale, qui riportato, potrebbe essere imputabile ad una migrazione dall'intestino, quale evento *post-mortem* o generata da fenomeni di *stress* acuto derivanti dall'effetto del trascinarsi durante la cattura.

### Bibliografia

Collins F.W., Walsh C.J., Gomez-Sala B., Guijarro-García E., Stokes D., Jakobsdóttir K.B., Burns F., Cotter P.D., Rea M.C., Hill C. & Ross R.P. (2021). The microbiome of deep-sea fish reveals new microbial species and a sparsity of antibiotic resistance genes. *Gut Microbes*, 13(1): 1921924.  
Demarta A., Tonolla M., Caminada A.P., Ruggeri N. & Peduzzi R. (1999). Signature region within the 16S rDNA sequences of *Aeromonas popoffii*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 172(2) : 239-246.  
Ettoumi B., Bouhajja E., Borin S., Daffonchio D., Boudabous A. & Cherif A. (2010). Gammaproteobacteria occurrence and microdiversity in Tyrrhenian Sea sediments as revealed by cultivation-dependent and-independent approaches. *Syst. Appl. Microbiol.*, 33(4) : 222-231.

## **ANISAKIS & PREVENZIONE: UN VIAGGIO DALLA TRANSILLUMINAZIONE ALLA LAMP VERSO UNA MIGLIORE PROTEZIONE DEL CONSUMATORE E DELL'OPERATORE DEL SETTORE**

Costa A.<sup>1</sup>, Patamia I.<sup>1</sup>, Fortino G.<sup>2</sup>, Cammilleri G.<sup>3</sup>, Costa A.<sup>3</sup>, Ferrantelli V.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Azienda Ospedaliero Universitaria Policlinico "G.Rodolico – San Marco" - Catania; <sup>2</sup>Veterinario libero professionista, Siracusa; <sup>3</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia – Palermo

Il consumo di prodotti ittici ha sempre costituito per l'uomo una irrinunciabile fonte di nutrimento di alto valore con la sua ricchezza in proteine "nobili", aminoacidi, grassi insaturi, sali minerali e vitamine. Purtroppo il pesce rappresenta anche una possibile fonte alimentare di patogeni. Le malattie parassitarie trasmesse attraverso la fauna ittica non sono state oggetto, sino a qualche decennio addietro, di rilevante interesse nei Paesi occidentali. Tuttavia, la esponenziale crescita del commercio internazionale di prodotti alimentari, il cambiamento delle abitudini culinarie, gli spostamenti di sempre più numerosi individui nell'ambito del turismo "esotico", hanno portato ad un rinnovato interesse per queste infezioni. Valga per tutti il "caso" Anisakiasi. Si tratta di una malattia zoonotica causata dal consumo di prodotti della pesca, infestati da larve al terzo stadio (L3) di nematodi appartenenti alla famiglia Anisakidae, consumati crudi, poco cotti o sottoposti a processi di conservazione non in grado di devitalizzarne le larve che sono comunemente presenti nella cavità del corpo e nei muscoli di molte specie ittiche. Gli adulti dei nematodi anisakidi risiedono nella mucosa dello stomaco dei mammiferi marini. Le femmine producono uova non embrionate che verranno eliminate, attraverso le feci, in ambiente acquatico dove verranno embrionate subendo due mute. Quindi fuoriescono come larve al terzo stadio (L3). Tali larve saranno ingerite dai crostacei, matureranno e diverranno infettive per gli ospiti paratenici quali pesci e cefalopodi. In seguito all'ingestione da parte di questi, le larve L3 migreranno dall'intestino alla cavità addominale e in alcuni casi anche al muscolo scheletrico. Attraverso la predazione, le larve L3 possono essere trasmesse tra ospiti paratenici. Pesci e calamari, contenenti larve di terzo stadio (L3), sono infettivi sia per l'uomo sia per i mammiferi marini. Mammiferi marini o uccelli marini, ingerendo i pesci, consentono il completamento del ciclo biologico del parassita. In questi animali, rappresentanti gli ospiti definitivi, le larve subiranno altre due mute maturando sino al quarto stadio larvale o preadulto (L4) per poi passare alla forma adulta. Invece, a seguito dell'ingestione da parte dell'uomo, le larve penetrano nella mucosa gastrica e intestinale, causando i sintomi dell'anisakiasi. Le manifestazioni cliniche dell'anisakiasi sono rappresentate da forme gastrointestinali, ad andamento acuto o cronico, forme ectopiche eventualmente associate a manifestazioni di tipo allergico. Anisakiasi e reazioni gastro-allergiche possono essere prevenute consumando pesce congelato. Il congelamento previsto dal Regolamento (CE) N. 853/2004 prevede il trattamento dei prodotti ittici ad una temperatura di -20 °C per 24 ore al cuore del prodotto. Cottura: sottoponendo il prodotto ittico a temperature superiori a 60 °C per almeno 1 minuto, viene garantita la devitalizzazione delle larve. È stato riscontrato che si possono avere reazioni allergiche anche manipolando i prodotti ittici, costituendo una "malattia professionale". In quest'ottica anche la normativa vigente prevede che sia indispensabile "assicurare che i prodotti della pesca siano sottoposti ad un controllo visivo alla ricerca di endoparassiti visibili prima dell'immissione sul mercato. Il controllo visivo deve essere effettuato su un numero rappresentativo di campioni seppure non assicura un'adeguata prevenzione. Dal 2010 l'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare ha indicato come tutti i pesci d'acqua salata, non provenienti da allevamenti, devono essere considerati "a rischio" per la possibile presenza di parassiti vitali pericolosi per la salute umana. Numerose tecniche di biologia molecolare appaiono rispondere, in termini di specificità e sensibilità, a questa richiesta. Molto usata, la PCR-RFLP, la Real Time-PCR e potrebbero essere utilizzate per certificare prodotti ittici di allevamento o prodotti selvatici particolarmente richiesti da consumatori già sensibilizzati. La LAMP tuttavia per la semplicità di realizzazione risulta facilmente applicabile "sul campo" e potrebbe permettere una significativa riduzione dei rischi Anisakis-correlati per i consumatori e gli operatori del settore.

## STUDIO PRELIMINARE SULL'INFESTAZIONE DA *PROTEOCEPHALUS LONGICOLLIS* IN AGONE (*ALOSA FALLAX LACUSTRIS*) PESCATI NEL LAGO DI GARDA

De Benedetto G.<sup>1</sup>, Corti I.<sup>2</sup>, Malandra R.<sup>3</sup>, Riolo K.<sup>4</sup>, Giannetto A.<sup>4</sup>, Gaglio G.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Messina; <sup>2</sup>Agenzia di Tutela della Salute dell'Insubria, Como; <sup>3</sup>Veterinario già responsabile S.S. Mercati Generali, ATS Città Metropolitana di Milano; <sup>4</sup>Dipartimento di Scienze Chimiche, Biologiche, Farmaceutiche ed Ambientali, Università di Messina;

Da un punto di vista sistematico, la specie *Alosa fallax*, facente parte della famiglia Alosidae, include due sottospecie, entrambe presenti nell'area mediterranea: la cheppia (*Alosa fallax nilotica*), specie anadroma e l'agone (*Alosa fallax lacustris*), specie esclusivamente dulciacquicola. Quest'ultima risulta l'unico Clupeidae stanziale nei grandi laghi profondi prealpini, in alcuni dei quali, come il Lago di Garda, risulta particolarmente abbondante e apprezzata dai consumatori. Dal punto di vista morfologico, la caratteristica principale che permette di differenziare l'agone dalla cheppia è il numero di branchiospine, superiore nell'agone (circa 60-70). La dieta di *A. fallax lacustris* risulta molto varia ed include plancton e larve di insetti, fino piccoli teleostei, in base agli stadi di sviluppo. La pesca sia professionale che dilettantistica dell'agone è normata da diversi regolamenti regionali e locali, che ne definiscono le specifiche limitazioni.

Lo studio della fauna parassitaria di questa specie sul nostro territorio risulta ad oggi limitato alla ricerca di forme larvali di cestodi agenti di zoonosi come *Diphyllobothrium latum*, per questo motivo, è stata contestualmente valutata la presenza di altri elminti in esemplari di *A. fallax lacustris* pescati nel Lago di Garda.

Tra il 2019 e il 2022, 66 esemplari di *A. fallax lacustris* sono stati ispezionati durante le routinarie attività di controllo del pescato presso il Mercato Ittico di Milano; nello specifico è stata effettuata la valutazione dei contenuti gastroenterici e la speratura dei filetti per la presenza di forme adulte e/o larvali di elminti. Tutti i parassiti ritrovati sono stati fissati in etanolo al 70% e conferiti ai laboratori del Dipartimento di Scienze Veterinarie e del Dipartimento di Scienze Chimiche, Biologiche, Farmaceutiche ed Ambientali dell'Università di Messina per l'identificazione morfologica e molecolare. In laboratorio, parte dei parassiti campionati sono stati processati mediante diafanizzazione in glicerina per 24 ore ed altri sono stati colorati con la tecnica Semichon's carmine red per lo studio morfologico; da alcuni esemplari è stato estratto il DNA per l'amplificazione di due marcatori molecolari, *large subunit ribosomal RNA* (LSU rRNA) e *internal transcribed spacer* (ITS2 region) utilizzati per l'identificazione della specie.

Nessuno dei 66 agoni è risultato positivo alla speratura per la ricerca di forme larvali di cestodi, in 8 soggetti su 66 (12,1%; Im 13,4; Am 1,6), all'apertura della cavità celomatica, è stato possibile apprezzare la presenza di numerosi esemplari adulti di cestodi all'interno dei ciechi pilorici, i quali apparivano in alcuni casi completamente repleti di parassiti.

Sulla base delle valutazioni microscopiche e delle chiavi dicotomiche utilizzate per valutare le caratteristiche degli scolici e delle sezioni intermedie e terminali, è stato possibile identificare i parassiti rinvenuti come appartenenti al genere *Proteocephalus*.

L'analisi delle sequenze nucleotidiche e la ricerca di similarità con algoritmo BLAST per entrambi i marcatori hanno confermato l'appartenenza dei parassiti al genere *Proteocephalus*. La sequenza ITS2 ha permesso inoltre di identificare la specie come *P. longicollis* riportando una percentuale di identità pari al 98.5% (*E-value* 8e-92, *query cover* 94%).

Sulla base dei risultati ottenuti nel presente studio è stato possibile descrivere per la prima volta dal punto di vista morfologico e molecolare la presenza di *Proteocephalus longicollis* nell'unica specie di Clupeidae presente nelle nostre acque interne. Inoltre, l'assenza di forme larvali di cestodi agenti di zoonosi conferma i dati esistenti in letteratura sul basso rischio, di natura parassitaria zoonotica, in materia di Sanità pubblica per i consumatori di questa importante risorsa ittica. Sono in corso ulteriori indagini per approfondire l'epidemiologia di *P. longicollis* nelle acque interne italiane.



## CARATTERIZZAZIONE MORFOLOGICA E MOLECOLARE DI STADI ACTINOSPOREI DI PARASSITI MYXOZOA IN *BRANCHIURA SOWERBYI* (ANNELIDA: OLIGOCHAETA)

DeVos M., Cantori A., Luci V., Passarini A., Gustinelli A., Fioravanti M.L., Caffara M.

*Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie (DIMEVET), Alma Mater Studiorum Università di Bologna, Ozzano Emilia (BO)*

Recentemente in alcuni allevamenti tradizionali di pesci rossi (*Carassius auratus auratus*) siti in provincia di Modena si sono riscontrati episodi ricorrenti di infezioni del tessuto muscolare e della cute delle pinne ricollegabili ad infezioni da Myxozoa, con particolare riferimento a *Myxobolus lentisuturalis* e *Thelohanellus hoffmanni*. È noto che molti generi di Myxozoa utilizzano anellidi, ed in particolare oligocheti, come ospiti alternati per il completamento del loro ciclo biologico e lo sviluppo di stadi actinosporei infettanti per gli ospiti ittici. Al fine di verificare la presenza degli ospiti alternati di *M. lentisuturalis* e *T. hoffmanni* e la loro eventuale positività per actinospore nelle realtà di allevamento considerate sono stati effettuati campionamenti di materiale fangoso dal fondo delle vasche che ospitavano i pesci infetti. Durante i mesi primaverili del 2022 e del 2023 sono stati condotti 4 campionamenti di fango (2/anno); in laboratorio il materiale fangoso è stato setacciato e gli oligocheti presenti sono stati raccolti, lavati e posti in piastre multipozzetto con acqua deionizzata. Gli oligocheti sono stati suddivisi in base alle dimensioni in “grandi” e “piccoli”. Le piastre sono state mantenute a temperatura ambiente ed osservate allo stereomicroscopio a giorni alterni per un periodo di circa 2 mesi; dopo ogni osservazione l’acqua di ogni pozzetto veniva cambiata. In caso di presenza di actinospore, l’acqua veniva filtrata attraverso un filtro con maglie di 20 µm, posta all’interno di eppendorf da 2 ml e congelata a -20 °C per la tipizzazione molecolare dopo aver fotografato e misurato al microscopio ottico gli elementi parassitari. Tutti gli oligocheti “grandi” sono stati identificati in base ai caratteri morfologici come appartenenti alla specie *Branchiura sowerbyi*, mentre i “piccoli” genericamente come tubificidi. Solo le branchiure hanno rilasciato diversi tipi di stadi actinosporei che dal punto di vista morfologico sono stati identificati come appartenenti a 3 gruppi collettivi: Neoactinomyxum (3 tipi), Aurantiactinomyxon (2 tipi) e Raabeia (1 tipo). Mediante analisi molecolare è stato inoltre possibile identificarli associandoli ai relativi stadi myxosporei ed in particolare: Neoactinomyxum tipo 1 ha evidenziato 100% di similarità con *Thelohanellus wangi*, Neoactinomyxum tipo 2 e 3 similarità del 99,5% con *T. wuhanensis*, Aurantiactinomyxon tipo 1 e 2 elevata similarità con *Thelohanellus* sp. ed infine Raabeia con 100% di identità con *M. lentisuturalis*.

Alcuni esemplari di *B. sowerbyi* risultati negativi sono stati inoltre infettati con una sospensione di spore di *M. lentisuturalis* prelevate da un pesce rosso infetto. Gli oligocheti sono stati mantenuti per circa 2 mesi (tempo stimato di incubazione in base alla letteratura) in un piccolo contenitore provvisto di aeratore ed alimentati con spirulina una volta alla settimana senza mai cambiare l’acqua. Trascorso il periodo d’incubazione l’acqua del contenitore è stata filtrata ed osservata al microscopio ottico individuando la presenza di actinospore riferibili morfologicamente a Raabeia, stadio alternato di *M. lentisuturalis*, identità poi confermata con l’analisi molecolare. Infine alcuni esemplari di *B. sowerbyi* infettati sperimentalmente sono stati sottoposti ad esame istologico evidenziando nell’epitelio intestinale la presenza di pansporocisti di Raabeia a vari stadi di sviluppo.

Questa indagine ha confermato che negli allevamenti nazionali di pesce rosso *B. sowerbyi* è l’oligochete acquatico che più frequentemente rappresenta l’ospite alternato di diverse specie di Myxozoa, presenti anche in co-infezione. I risultati di questa indagine hanno permesso però di individuare soltanto per *Myxobolus lentisuturalis* il corrispondente stadio actinosporeo del tipo Raabeia nelle branchiure esaminate, mentre per *Thelohanellus hoffmanni* non è stato ancora possibile individuarlo. A tal riguardo va evidenziato come la tassonomia degli stadi actinosporei dei parassiti Myxozoa sia ancora oggetto di discussione, rendendo complessa la loro identificazione morfologica e molecolare e richiedendo quindi ulteriori studi sperimentali per chiarire la relazione tra gli stadi myxosporei ed actinosporei presenti rispettivamente negli ospiti ittici e negli anellidi bentonici.

## VALUTAZIONE PRELIMINARE DELLE MISURE DI BIOSICUREZZA NELLE TROTTICOLTURE DELLA PROVINCIA AUTONOMA DI TRENTO

Franzago E.<sup>1</sup>, Dorotea T.<sup>2</sup>, Casarotto C.<sup>1</sup>, Marchetti G.<sup>1</sup>, Bonato P.<sup>3</sup>, Dalla Pozza M.<sup>1</sup>, Toson M.<sup>1</sup>, Bille L.<sup>1</sup>; Cocco A.<sup>1</sup>, Callegaro A.<sup>1</sup>, Lunardi L.<sup>1</sup>, Mulatti P.<sup>1</sup>, Toffan A.<sup>1</sup>, Dellamaria D.<sup>1</sup>, Bortolotti L.<sup>4</sup>, Fabris A.<sup>5</sup>, Mazzucato M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Venezia, Legnaro, PD; <sup>2</sup>Azienda Sanitaria ULSS 6 Euganea, Padova, PD; <sup>3</sup>Azienda Sanitaria ULSS 7 Pedemontana, Bassano del Grappa, VI; <sup>4</sup>Azienda Provinciale per i Servizi Sanitari, Trento, TN; <sup>5</sup>Associazione Piscicoltori Italiani (API), Verona, VR

Secondo quanto stabilito dalla nuova normativa in sanità animale (Reg. UE 2016/429 e atti delegati e d'esecuzione), un aspetto molto importante in allevamento è la prevenzione e la precoce individuazione di patologie conosciute ed emergenti. Per questo motivo l'autorità competente deve svolgere una sorveglianza negli allevamenti basata sui rischi di introdurre e diffondere le malattie infettive. Di conseguenza le visite di sanità animale previste si svolgeranno secondo una frequenza stabilita su una valutazione del rischio rappresentato dallo stabilimento. E' cura dell'autorità competente determinare questo livello di rischio, secondo una lista di parametri da prendere in considerazione che vanno dalla possibilità di diffusione diretta di patogeni attraverso l'acqua ai movimenti di animali, senza dimenticare il sistema di biosicurezza e tutti gli aspetti correlati a esso. Per poter svolgere in modo efficace tale valutazione, è necessario disporre di informazioni relative a: caratteristiche strutturali, gestionali e di biosicurezza delle aziende, geolocalizzazione lungo le aste fluviali, connessione delle aziende con il reticolo idrografico e individuazione di zone di ripopolamento della fauna selvatica.

Il presente studio è la fase preliminare di un progetto di ricerca svolto dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSVe) che vede coinvolti diversi laboratori dello stesso e la collaborazione con l'Azienda Provinciale per i Servizi Sanitari della Provincia autonoma di Trento (APSS TN) e l'Associazione Piscicoltori Italiani (API). Lo scopo principale della ricerca è l'identificazione di problematiche legate ad aspetti sanitari negli allevamenti di trotticoltura, grazie ad un approccio GIS-based che combini aspetti di biosicurezza con elementi geografici e caratteristiche ambientali nell'area di studio. In questa fase preliminare l'obiettivo è stato quello di identificare i fattori legati alla biosicurezza e di oggettivare quanto ciascuno di essi possa influenzare il livello di biosicurezza in uno stabilimento d'acquacoltura.

Il territorio scelto come base di studio è stato quello della Provincia Autonoma di Trento (PAT) in quanto storicamente vocata all'attività di acquacoltura (come tutte le regioni del Nord-Est Italia) e con una forte predominanza di allevamenti di trota iridea. In questa fase preliminare sono stati presi in considerazione 57 allevamenti di salmonidi della PAT. La raccolta dei dati sulle misure di biosicurezza, di un arco temporale che va dal 2020 al 2022, è stata effettuata utilizzando la checklist dell'allegato F del vecchio Decreto Legislativo n. 148 del 2008, che le autorità competenti hanno utilizzato regolarmente fino al 2022. In primo luogo, il gruppo di lavoro IZSVe ha identificato gli elementi della checklist che si riferiscono agli aspetti di biosicurezza. Dopodiché, un gruppo di sei esperti individuati tra vari settori (dipendenti aziende mangimistiche, liberi professionisti e dipendenti delle aziende sanitarie), ha sottoposto questi fattori ad un'analisi utilizzando il metodo dell'expert elicitation, al fine di valutare il rischio di introduzione e diffusione di malattie infettive dei pesci in un allevamento.

L'expert elicitation ha identificato cinque fattori critici su cui focalizzarsi: 1) Pulizia e disinfezione dei camion; 2) Regolarità nella rimozione dei pesci morti; 3) Protezione dagli uccelli ittiofagi; 4) Utilizzo di attrezzature dedicate nei diversi settori dell'allevamento; 5) Presenza di aree separate dedicate al carico dei pesci morti.

La diversa tipologia di allevamenti presenti nell'area di studio (ad es. diversi indirizzi d'attività) ha generato alcune difficoltà nella raccolta, gestione ed elaborazione dei dati, che hanno sicuramente limitato l'elicitation effettuata. Lo studio rappresenta comunque un punto di partenza per l'implementazione di un nuovo sistema di pesatura del rischio degli stabilimenti, che possa includere più parametri rispetto a quello attuale.

## PESCI ALIENI NELLE ACQUE INTERNE ITALIANE: POTENZIALE IMPATTO SANITARIO SULLE SPECIE ACQUATICHE AUTOCTONE

Gabetti A.<sup>1,2,3</sup>, Maganza A.<sup>1,2,3</sup>, Esposito G.<sup>1,2</sup>, Pizzul E.<sup>4</sup>, Bertoli M.<sup>4</sup>, Prearo M.<sup>1,2</sup>, Pastorino P.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Piemonte, Liguria and Valle d'Aosta, Via Bologna, 148 – 10154 Torino, Italy; <sup>2</sup>Centro di Referenza Regionale per la Biodiversità degli ambienti acquatici, Via L. Maritano, 22 – 10051 Avigliana (TO), Italy; <sup>3</sup>DBIOS, Università degli Studi di Torino, Via Accademia Albertina, 13 – 10123 Torino, Italy; <sup>4</sup>Dipartimento di Scienze della Vita, Università degli Studi di Trieste, Via L. Giorgieri, 5 – 34127 Trieste, Italy.

L'introduzione di specie aliene al di fuori del loro areale di origine è spesso associata alla co-introduzione di patogeni alieni: alcuni di essi possono rappresentare un pericolo per le specie autoctone, i cui sistemi immunitari non sono preparati a contrastare nuove infezioni e per l'uomo, che può contrarre malattie zoonotiche. Al tempo stesso, le specie aliene possono risultare suscettibili ai patogeni già presenti nell'ecosistema di introduzione: questo fenomeno può alterare le dinamiche locali ospite-patogeno, portando quindi ad un aumento dell'abbondanza di alcuni patogeni e aggravando la minaccia che questi già rappresentavano per le specie autoctone. Le acque interne sono particolarmente soggette all'introduzione volontaria o accidentale di specie alloctone: in Italia ad oggi sono circa 43 le specie ittiche non autoctone acclimatate e che presentano popolazioni che si auto sostengono (AIIAD, 2021). La maggior parte di esse sono pesci Cipriniformi, Perciformi e Siluriformi di origine Euro-Asiatica e Nord-Americana, che nei corpi idrici italiani hanno trovato condizioni climatiche ed ecologiche ideali per insediarsi e in alcuni casi diventare invasivi (*Invasive Alien Species*). Le problematiche sanitarie correlate alla presenza di queste specie esotiche sono ancora poco conosciute e in particolare non sono ancora del tutto noti i rischi per la fauna acquatica autoctona. Ad oggi la maggiore minaccia sanitaria per le specie autoctone è probabilmente rappresentata dalla pseudorasbora (*Pseudorasbora parva*), ciprinide invasivo di origine asiatica introdotto accidentalmente insieme ad altri pesci importati per acquacoltura e pesca. È considerato il principale portatore sano del patogeno *Sphaerothecum destruens*, parassita intracellulare che può infettare salmonidi e ciprinidi autoctoni, con esito solitamente letale (Andreou *et al.*, 2011). Rappresenta un pericolo significativo anche il persico sole (*Lepomis gibbosus*), introdotto dagli Stati Uniti principalmente a scopo ornamentale e divenuto anch'esso invasivo nelle acque italiane. Sembra che sia coinvolto nell'alterazione delle dinamiche ospite-virus (*Ranavirus*) nelle popolazioni di anfibi autoctoni appartenenti ai generi *Lissotriton* e *Triturus*. L'introduzione del persico sole è stata associata ad *outbreak* di ranavirosi con conseguente declino delle popolazioni di questi anfibi, probabilmente a causa dell'impatto del pesce alloctono sul loro comportamento alimentare e sui livelli di stress (Rosa *et al.*, 2022). Il persico sole è inoltre ospite di diversi parassiti monogeni nord americani. Tra le specie di più recente introduzione, il ghiozzo testa grossa (*Neogobius melanostomus*), gobide originario del Mar Nero e Mar Caspio, potrebbe rappresentare un importante pericolo sanitario in quanto può essere vettore di setticemia emorragica virale (SEV), trasmissibile ai salmonidi autoctoni appartenenti ai generi *Salmo* e *Thymallus* (Kornis *et al.*, 2012). Numerose altre specie ittiche alloctone come il siluro (*Silurus glanis*), i pescigatto (*Ameiurus melas* e *Ictalurus punctatus*) e il persico trota (*Micropterus salmoides*) hanno introdotto nelle acque italiane parassiti e patogeni esotici, ma non è ancora del tutto chiaro l'impatto che questi hanno sulla fauna acquatica autoctona. Gli studi futuri sull'impatto della fauna ittica aliena sulla biodiversità dovranno sicuramente approfondire la possibilità di *spillover* e il ruolo che questi pesci hanno nell'alterazione delle dinamiche locali ospite-patogeno.

### Bibliografia

- AIIAD, Associazione Italiana Ittiologi Acque Dolci (2021). Check list Ittiofauna italiana v.3.0.0 del 05/03/2021.  
 Andreou D., Gozlan R.E., Stone D., Martin P., Bateman K. & Feist S.W. (2011). *Sphaerothecum destruens* pathology in cyprinids. *Dis. Aqua. Org.*, 95: 145-151.  
 Kornis M.S., Mercado-Silva N. & Vander Zanden M.J. (2012). Twenty years of invasion: a review of round goby *Neogobius melanostomus* biology, spread and ecological implications. *J. Fish Biol.*, 80: 235-285.  
 Rosa G.M., Botto G.A., Mitra A.T., de Almeida J.S., Hofmann M., Leung W.T. & Soares C. (2022). Invasive fish disrupt host-pathogen dynamics leading to amphibian declines. *Biological Conservation*, 276: 109785.

**PROGETTO “LAGHI VIVI 2.0” REALIZZAZIONE DI UN CENTRO ITTIOGENICO PER LA VALORIZZAZIONE, CONSERVAZIONE E SVILUPPO SOSTENIBILE DEL PATRIMONIO LACUSTRE SICILIANO IN ATTUAZIONE DELLA MISURA A TITOLARITA' N. 2.51 DEL PO - FEAMP 2014-2020 SULL'AREALE DEL LAGO BIVIERE DI LENTINI**

Iaria C.<sup>1</sup>, Capparucci F.<sup>1</sup>, Gervasi C.<sup>1</sup>, Gaglio G.<sup>2</sup>, Lanteri G.<sup>1</sup>, Marino F.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Università degli Studi di Messina, Dipartimento di Scienze Chimiche, Biologiche, Farmaceutiche ed Ambientali. Viale Ferdinando Stagno d'Alcontres 31, Messina; <sup>2</sup>Università degli Studi di Messina, Dipartimento di Scienze Veterinarie, Polo Universitario dell'Annunziata, Messina.

L'obiettivo principale del presente progetto è la creazione di un centro ittiogenico regionale per la produzione di specie ittiche endemiche da reimmettere in bacini lacustri e fluviali siciliani, localizzato nell'area delimitata di pertinenza dell'Assessorato Acque e Rifiuti sul Lago di Lentini (SR). Al progetto Lago Biviere partecipano 9 soggetti pubblici ed 1 Università (UNIME) il cui Responsabile Scientifico è il Prof. Fabio Marino.

Ad oggi, il lago ha una circonferenza di 13 km e viene utilizzato per accumulare acque provenienti dai fiumi San Leonardo e Simeto usate per scopi industriali e per l'irrigazione dei campi. Il Biviere in questi decenni si è popolato di una innumerevole varietà di uccelli acquatici, tra cui spiccano aironi cinerini, garzette dal ciuffo, cicogne, cormorani, gabbiani. L'ittiofauna del lago risulta rappresentata essenzialmente da carpe comuni e a specchio, e occasionali lucci e persici reale.

Il programma delle operazioni effettuate presso il lago Biviere di Lentini ha previsto uno studio delle biocenosi, effettuando campionamenti di tipo chimico-fisico di base (Temperatura, pH, Conducibilità, DO) composti azotati (ammoniacca, nitriti e nitrati) e analisi per la rilevazione di eventuali sostanze chimiche dannose quali pesticidi organoclorurati, metalli pesanti, composti alifatici clorurati cancerogeni e clorobenzeni.

I parametri delle analisi chimico-fisiche dell'acqua risultano al di sotto dei limiti previsti dalle normative vigenti. Dai rilievi anatomo-istopatologici non sono emersi quadri riferibili a malattie infettive insistenti sul sito. Tuttavia, sono state condotte indagini microbiologiche su teleostei, acqua e sedimenti al fine di conoscere le caratteristiche microbiologiche della colonna d'acqua e la presenza di specie batteriche potenzialmente patogene per i pesci.

Gli screening batteriologici sono stati condotti su 6 esemplari di *C. carpio* (1000-1500 g). Dopo il campionamento i pesci sono stati trasportati in buste sterili presso l'Università degli Studi di Messina, sono stati sottoposti ad esame autoptico e sono stati effettuati prelievi in modo asettico di campioni dal rene cefalico e rene caudale per indagare la presenza di batteri patogeni. I terreni utilizzati per la crescita dei microorganismi erano Blood (BA) agar e Tryptic Soy Agar (TSA) e le piastre sono state incubate a 30°C. Le colonie cresciute dopo 48h sono state isolate e sono attualmente sottoposte a studi molecolari al fine di ottenere un'identificazione a livello di specie della comunità microbica, relativa la frazione coltivabile, se presente nel sistema circolatorio e per valutarne la presenza di eventuali patogeni.

Sui soggetti campionati durante la stagione invernale e primaverile, sono state effettuate indagini parassitologiche per la ricerca di ecto ed endoparassiti. Nello specifico, sono state ispezionate le branchie e la cute per la presenza di ectoparassiti mediante scraping cutanei e biopsie branchiali; inoltre, è stata effettuata una valutazione dei contenuti gastroenterici per la ricerca di endoparassiti mediante le classiche tecniche parassitologiche. Le indagini effettuate non hanno evidenziato la presenza di ectoparassiti branchiali e cutanei; in due soggetti adulti di carpa comune (*Cyprinus carpio*) è stato possibile evidenziare la presenza di forme larvali di nematodi, sia libere nel lume intestinale, sia incistate a livello delle sierose. Le prime indagini effettuate hanno permesso di identificare i parassiti come *Contracaecum rudolphii*. Ulteriori indagini sulla parassito fauna delle specie ittiche presenti nel lago saranno oggetto di futuri studi.

## **DEVELOPMENT OF FUNCTIONAL FISH FEED BASED ON BIOACTIVE COMPOUNDS OF MARINE AND HERBAL ORIGIN**

Iaria C.<sup>1</sup>, Capparucci F.<sup>1</sup>, Romito F.<sup>2</sup>, Lanteri G.<sup>1</sup>, Marino F.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Department of Chemical, Biological, Pharmaceutical and Environmental Sciences, University of Messina, Messina, Italy;*

<sup>2</sup>*Panittica Italia, Torre Canne di Fasano (BR)*

The project FEEDACTIV, (Development of functional fish feed based on bioactive compounds of marine and herbal origin) HORIZON-MSCA-2021-SE-01, focuses on the development of innovative aquaculture feed based on natural bioactive compounds that boost the immune system of farmed fish. Various species of marine microalgae as well as seaweed and land based herbal plants are going to be used as enrichment of the fish feed and hopefully as partial fishmeal substitution with low cost ingredients. The use of natural compounds, polyunsaturated fatty acids ( $\omega$ -3,  $\omega$ -6 and  $\omega$ -7), phenols, carotenoids and protein from marine and land based flora, aims to improve the breeding and quality of farmed species while drastically reducing the annual cost of the aquaculture companies by focusing on the processes that boost the immune system of the fish. The production of these functional products will cover the consumers' demands for the consumption of foods with increased functionality and absence of any chemical additives giving them the following comparative advantage over the competition. The overarching objective of this project is to form an international and inter-sectoral network of organizations working on a joint research program in the fields of aquaculture and feed formulation. Therefore, FEEDACTIV will bring together experts from industry and academia that specialize in interdisciplinary/inter-sectoral, yet highly complementally, research areas of Aquaculture, Animal Feed Production, Feed/Food safety, Process Analysis and Design of food products. It is a joint research and innovation project that will develop a strong partnership involving 8 partners from 3 European countries (Romania, Greece, and Italy) and with different technical backgrounds from the academic and non-academic sectors (SMEs). The execution of the project and the knowledge sharing will be based on secondments (exchanges) of research and innovation staff with an in-built return mechanism strengthening collaborative research among the different countries and sectors. The University of Messina is particularly involved in the work package 7 (Evaluation of the effect of innovative feed products during commercial operation aquaculture conditions on growth, survival, and parasitic load) to evaluate on a large scale the potential effects of the proposed feeds that will be provided to farmed fish species. Firstly, the evaluation will be in respect of the fish's growth rates and health monitoring. Secondly, on the assessment of their disease resistance. Emphasis will be given to sea bass, sea bream fry and potentially rainbow trout juveniles. The work package is divided in two different tasks, Task 7.1 Evaluation of growth rates on large scale under control conditions and Task 7.2. Evaluation of the disease resistance based on visual monitoring of both external morphology and behavioural changes.

## LESIONI PROLIFERATIVE ASSOCIATE A INFEZIONI DA PARASSITI MYXOZOA IN *CARASSIUS AURATUS* ALLEVATI IN ITALIA

Luci V.<sup>1</sup>, Tedesco P.<sup>1</sup>, Gustinelli A.<sup>1</sup>, Cantori A.<sup>1</sup>, Verin R.<sup>2</sup>, Quaglio F.<sup>2</sup>, Fioravanti M.L.<sup>1</sup>, Caffara M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento Scienze Mediche Veterinarie (DIMEVET), Alma Mater Studiorum Università di Bologna, Ozzano Emilia (BO);

<sup>2</sup>Dipartimento di Biomedicina Comparata e Alimentazione (BCA), Università di Padova, Legnaro (PD)

Nel corso del 2022 si sono verificati in pesci rossi (*Carassius auratus*) allevati in un impianto dell'Emilia-Romagna due episodi di infezione da parassiti Myxozoa associati a lesioni a carattere proliferativo a carico rispettivamente della cute e del rene.

**Caso 1:** nell'aprile 2022 sono pervenuti in laboratorio 20 pesci rossi che presentavano a carico delle pinne formazioni nodulari grigio brunastre di dimensioni da 2 fino a 5 mm di diametro, da isolate a confluenti; l'allevatore riportava che tali lesioni si registravano in circa l'1% degli esemplari presenti nei diversi bacini d'allevamento. Previa sedazione con MS-222, alcuni noduli venivano asportati e sottoposti ad esame microscopico a fresco; le lesioni nodulari di cinque esemplari deceduti durante il trasporto venivano fissate in formalina tamponata al 10% per l'esame istologico. I pesci non mostravano altri segni di malattia ed il decorso risultava benigno con completa remissione delle lesioni nodulari nei pesci mantenuti in stabulazione a distanza di circa 1 mese dall'intervento di asportazione. L'esame microscopico a fresco sul contenuto delle lesioni proliferative metteva in evidenza la presenza di un numero elevatissimo di elementi parassitari morfologicamente riferibili a myxospore del genere *Thelohanellus* (Myxozoa, Myxobolidae). In letteratura si riportano lesioni sovrapponibili a quelle da noi osservate in pesci rossi importati dalla Cina in Australia (Lewisch et al., 2015) nel corso di un'infezione da *Thelohanellus hoffmanni*. All'esame istopatologico, lungo i raggi ossei delle pinne si evidenziavano formazioni nodulari cistiche a carico del derma contenenti numerosi elementi parassitari riferibili a Myxozoa a diversi stadi di sviluppo. Le cisti si presentavano delimitate da una capsula lievemente eosinofila circondata da infiltrazioni di melanomacrofagi, a cui aderiva uno strato interno composto di cellule appiattite alternate a cellule più rotondeggianti e un successivo strato di cellule più esterne. Si evidenziava inoltre la presenza multifocale di linfociti e, più sporadicamente, di cellule granulari eosinofili. In base ai dati in nostro possesso questa rappresenterebbe la prima segnalazione di questa specie parassitaria in pesci rossi allevati in Italia.

**Caso 2:** nel novembre 2022 sono pervenuti in laboratorio 30 pesci rossi con evidente deformazione del profilo laterale dell'addome, in metà dei casi monolaterale. Nei casi più gravi i pesci mostravano difficoltà natatorie e di controllo del galleggiamento. In allevamento risultava colpito fino al 5% dei pesci presenti nei bacini campionati. Dodici esemplari sono deceduti nel corso del trasporto in laboratorio e sono stati subito sottoposti ad esami necroscopico, parassitologico completo, batteriologico ed istologico secondo metodiche di laboratorio standard. All'apertura della cavità addominale si evidenziavano masse di aspetto spugnoso e dimensioni tali da occuparne la maggior parte del volume, andando a comprimere tutti gli altri organi interni. L'esame microscopico a fresco di una porzione della massa metteva in evidenza un tessuto formato da cellule simili ad adipociti a cui si intercalavano tubuli renali in regressione e, nel parenchima alterato, rare spore di parassiti Myxozoa riferibili al genere *Hoferellus*. In letteratura risulta ben conosciuta e descritta l'infezione renale da *Hoferellus carassii*, responsabile di ipertrofia renale e rene policistico nei pesci rossi e sovrapponibile al nostro caso. L'esame batteriologico risultava negativo mentre l'esame istologico del rene permetteva di osservare una diffusa e grave ectasia tubulare associata ad iperplasia ed ipertrofia delle cellule epiteliali organizzate a formare pliche e digitazioni papilliformi con numerosi trofozoiti intracellulari e spore di Myxozoa intraluminari libere.

I due casi sopra riportati rappresentano interessanti segnalazioni della recente introduzione di parassiti Myxozoa in un allevamento dell'Emilia-Romagna probabilmente in seguito all'ingresso di materiale biologico non controllato dal punto di vista parassitologico. Questo porta all'attenzione la necessità di operare con una certa continuità, per quanto possibile, una sorveglianza parassitologica applicata anche a queste realtà produttive, spesso poco considerate ma che possono diventare la porta di ingresso di nuovi patogeni sul territorio nazionale. Lewisch E, Soliman H, Schmidt P, El-Matbouli M. Morphological and molecular characterization of *Thelohanellus hoffmanni* sp. nov. (Myxozoa) infecting goldfish *Carassius auratus auratus*. *Dis Aquat Organ*. 2015, 115:37-46.

## PATOLOGIE VIRALI E BATTERICHE RILEVATE NELLE PISCICOLTURE ITALIANE DAL 2018 AL 2022

Lunardelli G.<sup>1</sup>, Franzago E.<sup>1</sup>, Dalla Pozza M.<sup>1</sup>, Toson M.<sup>1</sup>, Bille L.<sup>1</sup>, Rizzo S.<sup>1</sup>, Marsella A.<sup>1</sup>, Cocchi M.<sup>1</sup>, Manfrin A.<sup>1</sup>, Prearo M.<sup>2</sup>, Pastorino P.<sup>2</sup>, Salogni C.<sup>3</sup>, Susini F.<sup>4</sup>, Cardeti G.<sup>4</sup>, Bossù T.<sup>4</sup>, Agnetti F.<sup>5</sup>, Ferri N.<sup>6</sup>, Di Nocera F.<sup>7</sup>, Fusco G.<sup>7</sup>, Amoroso M.<sup>7</sup>, Guarino L.<sup>8</sup>, Vicari D.<sup>9</sup>, Cappai S.<sup>10</sup>, Toffan A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro, PD; <sup>2</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte Liguria e Valle d'Aosta, Torino, TO; <sup>3</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia Romagna, Brescia, BS; <sup>4</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana, Roma, RM; <sup>5</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Perugia, PG; <sup>6</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise, Teramo, TE; <sup>7</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno, Portici, NA; <sup>8</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Puglia e Basilicata, Foggia, FG; <sup>9</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia, Palermo, PA; <sup>10</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna, Sassari, SA

L'EURL (*European Union Reference Laboratory*,) per le malattie dei pesci e dei crostacei (*Technical University of Denmark - DTU*) mira ad armonizzare le procedure diagnostiche per le malattie in ambiente acquatico in collaborazione con i singoli Stati Membri, a cui ogni anno richiede di rendicontare, con un format specifico, riguardo i patogeni riscontrati nei pesci nei singoli territori nazionali. In Italia, il Centro di Referenza Nazionale per lo studio e la diagnosi delle malattie dei pesci, molluschi e crostacei (CRN), che risiede presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSVE), procede quindi a richiedere le informazioni necessarie ai laboratori dei vari IIZZSS d'Italia che si occupano di acquacoltura. I dati ricevuti vengono quindi integrati e validati dal CNR e inviati all'EURL. Come risultato finale viene prodotto un report annuale europeo. Il presente lavoro ha come scopo quello descrivere le più frequenti patologie virali e batteriche rilevate nel quinquennio 2018-2022 nel territorio italiano.

I dati nazionali relativi al periodo di studio sono stati raccolti ed ordinati in un file Excel e sintetizzati mediante tabelle e grafici.

Le positività per malattie elencate (Allegato II del Regolamento (UE) 2016/429), nello specifico setticemia emorragica virale (VHSV), necrosi ematopoietica infettiva (IHNV) e anemia infettiva del salmone (ISAV), si sono mantenute sostanzialmente costanti nel tempo. Nel caso della herpesvirus della carpa koi (KHV), dopo una percentuale di positività pari al 15% nel 2018 e 14% nel 2019, si è registrato un calo fino all'1% negli ultimi due anni. Il virus dell'edema della carpa (CEV) è risultato particolarmente presente nel 2019 e 2022, rispettivamente nel 25% e 45% dei campioni analizzati. Di rilievo è la totale assenza di segnalazioni per il virus della viremia primaverile della carpa (SVCV) nell'ultimo biennio. Per quanto concerne altre malattie virali di interesse, nel 2021 e 2022 si sono riscontrate positività per l'iridovirus (*Acipenser iridovirus European*, AcIV-E), rispettivamente 59% e 26% dei campioni testati. L'herpesvirus dei ciprinidi nei primi anni era presente in circa il 50% dei campioni mentre nel 2021 e 2022 rispettivamente nel 10% e 25%. Il virus del pesce gatto ed il virus dell'anguilla sono stati sporadicamente segnalati nel periodo di studio.

Per quanto riguarda la ricerca di altri patogeni, sono state prese in considerazione le specie più rappresentate nella piscicoltura italiana, secondo quanto riportato dall'API (Associazione Piscicoltori Italiani). Nella trota iridea i principali agenti patogeni ritrovati sono stati *Lactococcus garvieae*, e *Yersinia ruckeri* biotipo 2. Nel 2021 e 2022 è comparso *Flavobacterium* spp. in animali giovani. Nella trota fario i patogeni maggiormente riscontrati sono stati *Aeromonas salmonicida* ed *Aeromonas* atipiche (ad esempio *A. hydrophila* ed *A. veronii*). In branzino ed orata, sono di più frequente riscontro *Vibrio* spp. e *Photobacterium damsela*.

In considerazione delle variazioni nella prevalenza di taluni agenti patogeni esaminati, è importante continuare ad indagare le malattie ittiche, come del resto richiesto dall'EURL e dalla normativa vigente.

## LA PRODUZIONE ITTICA DA ACQUAPONICA: PROBLEMI E BENEFICI

Maganza A.<sup>1,2</sup>, Gabetti A.<sup>1,2</sup>, Schleicherová D.<sup>1,2</sup>, Pastorino P.<sup>1</sup>, Menconi V.<sup>1</sup>, Prearo M.<sup>1</sup>, Esposito G.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Via Bologna, 148 – 10154 Torino, Italia; <sup>2</sup>DBIOS, Università degli Studi di Torino, Via Accademia Albertina, 13 – 10123 Torino, Italia.

L'acquaponica (d'acqua dolce e salina) è l'integrazione di acquacoltura ed idroponica in un unico sistema di produzione a riciclo d'acqua chiuso e continuo (*Recirculating Aquaculture System* - RAS). Questo processo permette a pesci, piante e batteri di prosperare in simbiosi, a condizione che il sistema sia correttamente bilanciato.

Pertanto, questa nuova forma di acquacoltura integrata mostra numerosi vantaggi sia dal punto di vista della sostenibilità sia per quanto riguarda gli aspetti legati al benessere animale. Tuttavia, la selezione delle piante unitamente alle specie ittiche è di fondamentale importanza in termini di idoneità alla produzione acquaponica. In particolare, il *Silver barb* o barbo di Giava (*Barbonymus gonionotus*), la tilapia blu (*Oreochromis aureus*) e la tilapia del Nilo (*O. niloticus*) sono considerate tra le specie meglio adattabili per questi sistemi produttivi. Altre specie comunemente utilizzate sono, la carpa comune (*Cyprinus carpio*), il pesce rosso (*Carassius auratus*), il barramundi (*Lates calcarifer*), il persico trota (*Micropterus salmoides*), il pacu (*Piaractus mesopotamicus*) ed altri ancora.

Uno degli aspetti più complessi di questi sistemi, ai fini della salute e del benessere dei pesci, è la gestione della qualità dell'acqua. I parametri fisico-chimici dell'acqua (e.g., temperatura, ossigeno disciolto, ammoniaca, nitriti e nitrati, fosforo) devono essere costantemente monitorati e bilanciati tra pesci, piante e batteri. Ma una delle sfide principali per il successo dell'acquaponica è legata alla prevenzione e profilassi delle malattie che possono colpire sia le specie ittiche che le specie vegetali associate.

I sistemi acquaponici non sono compatibili con l'utilizzo di composti chimici per il trattamento delle malattie dei pesci e delle piante. Ad esempio, gli antibiotici e gli antiparassitari possono compromettere l'attività del biofiltro ed altresì essere assorbiti ed accumulati sia dai pesci sia dalle piante, compromettendo la loro sopravvivenza. Per prevenire o gestire l'impatto di una determinata malattia, la disinfezione dell'acqua può ridurre o eliminare gli agenti patogeni, ma i metodi di disinfezione possono danneggiare la salute dei pesci o delle piante presenti; pertanto, devono essere utilizzati con estrema attenzione. Tuttavia, il rischio di introduzione di agenti patogeni in un sistema acquaponico può essere molto limitato se tutte le introduzioni sono fortemente ben gestite e generalmente può essere legato quasi esclusivamente all'introduzione di pesci infetti nel circuito produttivo. Gli agenti patogeni vengono introdotti anche attraverso altre vie, come l'aria, gli animali vettori (roditori o insetti), i mangimi, le attrezzature sporche e l'acqua di reintegro. È quindi necessario gestire tutte le operazioni in modo attento e procedendo con le dovute misure di biosicurezza per poter gestire al meglio la produzione senza incorrere in problematiche sanitarie difficili da gestire qualora si presentino.

Oggigiorno, in letteratura sono presenti solo pochi studi che descrivono la presenza di agenti patogeni nella produzione acquaponica. D'altra parte, secondo le nostre esperienze ed i nostri recenti studi, i problemi sanitari sono spesso causati da infezioni batteriche, parassitarie o fungine. Nello specifico, la setticemia da *Aeromonas* spp. (*A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. veronii*, *A. sobria*, etc.) è una delle più frequenti malattie batteriche ampiamente diffuse in acquacoltura e in acquaponica. Tra le specie di parassiti, *Ichthyophthirius multifiliis*, *Hexamita* spp., *Gyrodactylus* spp. e *Dactylogyrus* spp. sono le più impattanti. L'insorgenza di queste problematiche sanitarie all'interno di un ciclo produttivo in acquaponica rappresenta sempre un evento preoccupante e di difficile gestione una volta che si è palesato, limitando enormemente sia il ciclo produttivo vegetale che quello ittico, in considerazione del fatto che approcci terapeutici non sono facilmente attuabili senza avere ripercussioni negative sul ciclo produttivo stesso.

Quindi, l'espansione della produzione acquaponica in tutto il mondo evidenzia la necessità di elaborare metodi sanitari e protocolli adeguati nella prevenzione e nel controllo dell'insorgenza di malattie in questo tipo.



## ISOLAMENTO DI *CARNOBACTERIUM MALTAROMATICUM* IN ESEMPLARI DI GATTUCCIO (*SCYLIORHINUS CANICULA*) IN UN ACQUARIO PUBBLICO

Pastorino P.<sup>1</sup>, Colussi S.<sup>1</sup>, Bondavalli F.<sup>1</sup>, Gagliardi F.<sup>2</sup>, Corrias I.<sup>2</sup>, Pira A.<sup>2</sup>, Acutis P.L.<sup>1</sup>, Prearo M.<sup>1</sup>, Esposito G.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Via Bologna, 148 - 10154 Torino, Italy; <sup>2</sup>Acquario di Cala Gonone, Via La Favorita - 08022 Dorgali (NU), Italy.

Il presente studio illustra i risultati ottenuti a seguito di un evento di mortalità di esemplari di gattuccio (*Scyliorhinus canicula*) stabulati in un acquario pubblico italiano. Quattro gattucci aventi un peso medio di 732,3±49,6 g ed una lunghezza media 64,9±9,2 cm sono stati sottoposti ad accertamenti diagnostici routinari presso la S.S. Acquacoltura, Ittiopatologia e Biologia degli Ambienti Acquatici dell'IZS PLV di Torino. Il protocollo diagnostico utilizzato si è basato su analisi volte ad escludere o meno la presenza di diversi patogeni che minacciano le specie ittiche marine (come parassiti, batteri, Betanodavirus). Per quanto riguarda il primo approccio, su tutti gli esemplari è stato condotto un accurato esame anatomopatologico, seguito da un esame parassitologico completo; successivamente sono stati effettuati prelievi batteriologici, mediante anse sterili, direttamente da rene, occhio e cervello, seminando su piastre di Columbia Blood Agar e su TSA salato (2% di NaCl) e prelievi di organi per le indagini virologiche su base biomolecolare. Le colonie presenti sulle piastre di terreno di primo isolamento sono state clonate e identificate mediante tecnologia MALDI-TOF MS.

Tutti i soggetti sono risultati negativi all'esame parassitologico e alla Nodaviriosi. L'esame colturale è risultato positivo dall'occhio di 1 soggetto, con l'isolamento in purezza di *Carnobacterium maltaromaticum*. Due ceppi di *C. maltaromaticum* sono poi stati analizzati mediante amplificazione della regione genica interspaziatrice 16S-23S secondo il protocollo descritto da Pellè *et al.* (2005). I fattori di patogenicità *WecC-1* e *WecC-2* sono stati indagati applicando il protocollo descritto da Roh *et al.* (2020). Le sequenze ottenute sono state allineate attraverso il *software* Lasergene (DNASTAR) e analizzate attraverso il programma BLASTn. I due ceppi hanno mostrato una similarità rispettivamente del 99,56% e del 99,41% con la sequenza di riferimento MZ147002 depositata in GenBank (strain Cm\_5VM) e l'assenza della batteriocina Piscicolina A. Uno dei due isolati ha mostrato positività per il gene codificante per il fattore di patogenicità *WecC-1* e negatività per *WecC-2*. L'analisi della sequenza effettuata con BLASTn ha mostrato un'identità del 100% con la sequenza genomica di riferimento del ceppo patogeno 18 IS Cm depositata in GenBank (Numero di accesso CP045040).

L'isolamento di germi opportunisti appartenenti al genere *Carnobacterium* porta ad ipotizzare come questi potenziali patogeni possano rimanere in una sorta di latenza in un organo (cosiddetto "effetto cavallo di Troia") per poi eventualmente esplicare azione patogena durante episodi di stress (i.e., cambiamenti repentini della temperatura dell'acqua) che si possono verificare anche in ambiente controllato. L'effetto patogeno sui selaci è stato ampiamente descritto in letteratura, con la presenza di quadro anatomopatologico tipico delle streptococcosi con esoftalmo, accumulo di liquido ascitico in cavità addominale e presenza di emorragie nei diversi organi. Tuttavia, la patogenesi di questi batteri dovrebbe essere maggiormente studiata e chiarita anche in relazione alla variazione di condizioni ambientali ottimali.

### Bibliografia

- Pellé E., Dousset X., Prévost H. & Drider D. (2005). Specific molecular detection of *Carnobacterium piscicola* SF668 in cold smoked salmon. *Lett. Appl. Microbiol.*, 40: 364-368.
- Roh H.J., Kim B.S., Lee M.K., Park C.I. & Kim D.H. (2020). Genome-wide comparison of *Carnobacterium maltaromaticum* derived from diseased fish harbouring important virulence-related genes. *J. Fish Dis.*, 43(9): 1029-1037.

## VALUTAZIONE DELL'ANTIBIOTICORESISTENZA IN ISOLATI BATTERICI DA PESCI ORNAMENTALI D'IMPORTAZIONE NEL PERIODO 2020-2023

Prearo M.<sup>1</sup>, Bondavalli F.<sup>1</sup>, Pastorino P.<sup>1</sup>, Tomasoni M.<sup>1</sup>, Abbà M.<sup>1,2</sup>, Bezzo Llufrío T.<sup>1,2</sup>, Zanolì A.<sup>1,2</sup>, Maganza A.<sup>1,2</sup>, De Vita V.<sup>3</sup>, Amato G.<sup>3</sup>, Marra C.<sup>1</sup>, Dondo A.<sup>1</sup>, Zoppi S.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Piemonte, Liguria and Valle d'Aosta, Via Bologna, 148 – 10154 Torino, Italy; <sup>2</sup>DBIOS, Università degli Studi di Torino, Via Accademia Albertina, 13 – 10123 Torino, Italy; <sup>3</sup>La Casetta in Canada, Via Vittime delle Foibe, 19 - 10036 Settimo Torinese (TO), Italy.

Durante il monitoraggio sanitario effettuato nel triennio 2020-2023 in partite di pesci ornamentali commercializzati da una importante serra d'importazione del territorio piemontese, sono stati analizzati 883 pesci d'acquario. Da questo monitoraggio sono risultati positivi all'esame colturale 504 esemplari in cui è stato possibile identificare una specie batterica, dai quali è stato successivamente allestito l'antibiogramma mediante la tecnica di Kirby-Bauer su terreno Müller-Hinton (MH). È stato utilizzato un panel di 17 antibiotici, studiato appositamente per i pesci ornamentali, inseriti in 3 piastre diverse (Amoxicillina, Amoxicillina + Acido Clavulanico, Ampicillina, Cloramfenicolo, Eritromicina, Enrofloxacin, Florfenicolo, Flumequine, Furazolidone, Gentamicina, Lincomicina, Neomicina, Acido Oxolinico, Spectinomicina, Sulfadimetossina + Trimethoprim, Oxitetraciclina e Tetraciclina). Tutte le piastre sono state incubate per 24 ore in termostato refrigerato ad una temperatura di  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ . La valutazione dei range di inibizione, non essendo disponibili dei break point stabiliti per le specie ittiche, viene calcolata basandosi sui range inseriti nel *datasheet* delle case produttrici. Per la valutazione delle multiresistenze, le positività vengono suddivise in 5 gruppi distinti: gruppo 1 – multiresistenti, dove tutte le molecole presentano un alone inferiore al *breakpoint* stabilito; gruppo 2 – alta resistenza, dove presentano un alone nel range della sensibilità almeno 1-5 molecole del panel; gruppo 3 – media resistenza, dove presentano un alone nel range almeno 6-10 molecole del panel; gruppo 4 – bassa resistenza, dove presentano un alone nel range almeno 11-14 molecole del panel; gruppo 5 – bassissima resistenza, dove presentano un alone nel range della sensibilità 15-17 molecole del panel. Osservando i risultati complessivi, nel primo gruppo (germi multiresistenti), si inseriscono 48 ceppi isolati, pari al 9,52% (48/504). Considerando le specie batteriche, il genere *Aeromonas* è quello che presenta le maggiori multiresistenze con 28 ceppi su 48 (58,33%); fa seguito il genere *Pseudomonas* con 11 ceppi multiresistenti (11/48 pari al 22,92%) e il genere *Citrobacter* con 5 ceppi multiresistenti (5/48 pari al 10,42%). Al secondo gruppo (germi con alta resistenza), vengono compresi 301 ceppi batterici, pari al 59,72% (301/504); al terzo gruppo (batteri con media resistenza), sono inseriti 129 ceppi batterici, pari al 25,60% (129/504); al quarto gruppo (germi con una bassa resistenza), si segnalano solamente 25 ceppi batterici (25/504 pari al 4,96%), mentre nel quinto gruppo (germi a bassissima resistenza), si osserva un solo isolato (1/504 pari al 0,20%). Nella valutazione delle molecole antibiotiche testate nel panel utilizzato si osserva come florfenicolo, cloramfenicolo e gentamicina siano le molecole che presentano la maggiore sensibilità rispetto ai 504 isolati batterici (rispettivamente 351, 279 e 267 ceppi con un range di sensibilità tra il 50-70%); fanno seguito una serie di molecole che presentano sensibilità nel 20-36% dei germi testati (neomicina, flumequine, enrofloxacin, sulfamidico potenziato, spectinomicina e furazolidone). Valori decisamente più bassi, che si attestano tra il 9-19%, sono da ricondurre alle molecole come acido oxolinico, amoxicillina + acido clavulanico, tetraciclina, oxitetraciclina e amoxicillina. Infine, valori di sensibilità estremamente bassi sono stati riscontrati in ampicillina (26 isolati), eritromicina (25 isolati) e lincomicina (2 isolati).

Osservando i risultati ottenuti dagli antibiogrammi si osserva come il quadro generale della resistenza agli antimicrobici sia estremamente elevata, dove la maggior parte dei batteri isolati presenta condizioni di multiresistenza (48 ceppi su 504 isolati) o di alta resistenza (301 ceppi). Circa un quarto degli isolati invece presenta una condizione di media resistenza; invece, solo pochi ceppi batterici rientrano nel quarto e quinto gruppo. Ecco perché risulta indispensabile effettuare questi tipi di monitoraggio, ampliando la ricerca anche a geni di resistenza presenti nelle specie batteriche isolate e sicuramente utilizzando anche matrici diverse dai pesci, come l'acqua di trasporto, per evidenziare le eventuali criticità.

## MONITORAGGIO SANITARIO IN PESCI ORNAMENTALI D'IMPORTAZIONE NEL TRIENNIO 2020-2023

Prearo M.<sup>1</sup>, Pastorino P.<sup>1</sup>, Bondavalli F.<sup>1</sup>, Menconi V.<sup>1</sup>, Esposito G.<sup>1</sup>, Tomasoni M.<sup>1</sup>, Mugetti D.<sup>1</sup>, Abbà M.<sup>1,2</sup>, Bezzo Llufrío T.<sup>1,2</sup>, Zanolí A.<sup>1,2</sup>, Gabetti A.<sup>1,2</sup>, Amato G.<sup>3</sup>, De Vita V.<sup>3</sup>, Dondo A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Piemonte, Liguria and Valle d'Aosta, Via Bologna, 148 – 10154 Torino, Italy; <sup>2</sup>DBIOS, Università degli Studi di Torino, Via Accademia Albertina, 13 – 10123 Torino, Italy; <sup>3</sup>La Casetta in Canada, Via Vittime delle Foibe, 19 - 10036 Settimo Torinese (TO), Italy.

La valutazione dello stato di salute dei pesci ornamentali in ingresso nel nostro paese, rappresenta un pilastro essenziale nella gestione delle importazioni da paesi extra-EU; le analisi che devono essere fatte a campione su numerose partite in entrata direttamente dai centri di stabulazione che ne effettuano l'importazione servono in primo luogo per definire esattamente quali potenziali patogeni possiamo importare, effettuando una caratterizzazione del ceppo batterico isolato. Questo approccio risulta estremamente importante proprio per monitorare l'eventuale importazione di ceppi batterici particolarmente pericolosi per l'ittiofauna del territorio nazionale. Nel triennio preso in considerazione dal presente studio (2020-2022 più 3 mesi del 2023), sono stati prelevati direttamente da una grossa serra d'importazione che effettua il commercio dei pesci attraverso i canali consueti d'importazione con diversi paesi extra-UE o tramite transhipping direttamente dai produttori, diversi esemplari di pesci ornamentali (1-3 soggetti per partita) provenienti da lotti d'importazione differenti. Più precisamente sono stati campionati totalmente 883 soggetti (287 pesci nel 2020, 303 nel 2021, 261 nel 2022 e 32 nel 2023). Sono state campionate oltre 70 specie ornamentali diverse ed il numero maggiori di campioni prelevati nel periodo compreso sono stati di *Poecilia reticulata* (111 esemplari), *Carassius auratus* nelle sue diverse varietà (104), *Xiphophorus maculatus* (101), *Xiphophorus helleri* (45), *Colisa lalia* (35), *Paracheirodon innesi* (29) e *Corydoras paleatus* (28) che rappresentano oltre il 50% dei pesci analizzati. Su tutti i pesci, si è operato una anestesia profonda mediante l'utilizzo di MS-222 disciolto nell'acqua in overdose. Su ogni pesce analizzato è stato condotto un esame colturale di primo isolamento, mediante ansa sterile dal rene; l'esame colturale è stato effettuato su terreni di primo isolamento (AGS e TSA) mantenuti a temperatura controllata ( $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) ed esaminati giornalmente per 72 ore, per evidenziare eventuali positività. Le differenti colonie batteriche ottenute, sono state clonate su AGS ed inviate all'identificazione mediante MALDI-TOF. Degli 883 pesci ornamentali esaminati nel periodo di ricerca, 561 hanno evidenziato una crescita batterica, pari al 63,53% del totale (561/883); il restante 34,47% (322/883) non ha presentato nessuna crescita batterica. Tra le positività rilevate, il 10,16% (57/561) non ha avuto un riscontro in fase di riconoscimento mediante Maldi-tof, non permettendo di ottenere una classificazione certa del germe isolato (GNS). Le specie batteriche maggiormente isolate fanno parte per la percentuale più alta a generi considerati come patogeni opportunisti (genere *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Shewanella putrefaciens*) e in secondo luogo a patogeni secondari (come *Citrobacter*, *Plesiomonas shigelloides* e alcune specie di *Vibrio*); solo pochi isolati sono da considerarsi dei patogeni primari come *Edwardsiella tarda* e *Photobacterium damsela damsela*. Scendendo maggiormente nello specifico, sono stati isolati 179 ceppi di *Aeromonas sobria* (pari al 35,52% dei 504 isolati), 136 ceppi di *A. hydrophila* (26,98%), 31 ceppi di *Plesiomonas shigelloides* (6,15%), 22 ceppi di *A. veronii* (4,37%), 17 ceppi di *Vibrio cholerae* (3,37%), 15 ceppi di *Citrobacter freundii* (2,98%), 13 ceppi di *Shewanella putrefaciens* (2,60%), 12 ceppi di *Pseudomonas fluorescens* (2,38%), 6 ceppi di *V. parahaemolyticus* e *V. alginolyticus* (1,19% ciascuno), 2 ceppi di *Edwardsiella tarda* (0,40%) e 1 ceppo di *Photobacterium damsela damsela* (0,20%). Quindi, questi tipi di monitoraggio evidenziano come lo stato sanitario dei pesci in importazione sia in alcuni casi abbastanza precario. Lo stato di stress dovuto alle condizioni di allevamento in loco (stress di tipo alimentare, di densità di popolazione oltre che di stress causato dalle condizioni sanitarie e ambientali) e al trasporto spesso molto disagiata, effettuato in condizioni di sovraffollamento per lunghi periodi, portano ad avere del materiale ittico inevitabilmente soggetto a batteriosi secondarie che possono causare episodi anche gravi di mortalità all'arrivo.

**ABSTRACT**  
**Relatori del Workshop**

## BASICS OF GENETIC SELECTION

Faggion, S.

*Department of Comparative Biomedicine and Food Science, University of Padova, Legnaro (Padova)*

Selective breeding is the process of change the genetic properties of a population, from one generation to the next, by i) selecting the “best” individuals to be used as parents and ii) control the way in which the parents are mated (i.e. control inbreeding; Falconer and Mackay, 1996). Genetic selection provides a cumulative and permanent improvement of the traits of interest; moreover, the initial goal can be modified over time or combined with other goals.

The simplest form of selection methods is to choose individuals on the basis of their own phenotypic values (individual selection or mass selection). In this case, the risk of selecting animals from few parents producing the best offspring is really high, which in turn increases the risk of inbreeding. Individual pedigree data are thus needed and, thanks to the availability of panels with limited number of genetic markers (100-450 SNPs) to genotype parents and offspring and of specific algorithms to reconstruct parent–child relationships, *a posteriori* parentage assignment can be performed. Pedigree data are particularly useful to assess the genetic health of the broodstock and to control inbreeding, also avoiding the decrease of genetic diversity and the accumulation of deleterious genetic variations.

For the trait of interest, pedigree data and individual phenotypes are used to estimate genetic parameters (additive genetic variance, heritability, genetic correlations with other traits) and breeding values (EBV). Conventional selective breeding methods are then based on the selection of breeders based on their genetic merits (i.e. EBV) for the trait of interest; for traits that cannot be measured on the candidate breeders themselves (such as disease resistance), selective breeding rely on the prediction of the genetic merit of breeding candidates based on the phenotypic information of sib families. Hence, the selection of individuals is based on family-wise estimated breeding values predicted from phenotypes of a reference population, which consists full or half-sibs of the breeding candidates. This family selection method is currently the most used approach, but it is not very efficient or precise and results in a quite low accuracy in breeding value estimation (Gjedrem and Baranski 2009). The availability of high-density marker maps allows the advancement of genetic approaches, providing alternatives to traditional methods in breeding for disease resistance, such as genomic selection. Genomic selection is a method that estimates the effects of a large number of chromosomal regions, defined by a dense panel of genetic markers spread in the genome, without paying attention to the statistical significance of the effects, but aggregating such effects in the prediction of the genetic merit of a breeding candidate. It relies on genotyping, using genome-wide dense marker panels (mainly SNP) covering the whole genome, and phenotyping, of a reference population of individuals. Genotypes and phenotypes of the reference population are used to estimate the marker effects on the traits, which allow, when aggregated, the prediction of genomic EBV (GEBV). After being validated in a “test” population, marker effects can be used in the routine prediction of the genetic merit of breeding candidates which need to be only genotyped. Hence, with genomic selection, phenotyping needs to be performed only once for the individuals of the reference population, the assessment of the individual genetic merit for disease resistance becomes possible and the within-family component of the genetic variance can be exploited (Daetwyler et al., 2007). In this way, the selection of breeding candidates can be greatly anticipated in life.

### References:

- Daetwyler H.D., Villanueva B., Bijma P. & Woolliams J.A. (2007). Inbreeding in genome-wide selection. *J Anim Breed Genet*, 124: 369-376.
- Falconer D.S. & Mackay T.F.C. (1996). *Introduction to quantitative genetics*. Longman, Harlow, England.
- Gjedrem T. & Baranski M. (2009). *Selection methods*. In: *Selective breeding in aquaculture: an introduction*. Springer Dordrecht Heidelberg London New York.

## **APPLICATION EXAMPLES OF SELECTION PLANS: SALMONIDS**

Robledo D.

*The Roslin Institute and Royal (Dick) School of Veterinary Studies, University of Edinburgh, Easter Bush Campus, UK*

Salmonids are arguably the most important aquaculture group globally, representing one of the fastest growing food production systems. Atlantic salmon is the main farmed species, with an annual production value of over US\$15 billion. Due to their high price, salmoniculture leads technological innovation in aquaculture, including in selective breeding. Early success in the application of genomic tools in Atlantic salmon breeding programmes, exemplified mainly by the IPNV resistance QTL, has been fundamental for the rapid adoption of genomics in other species. Nowadays, Atlantic salmon breeding programmes are as advanced as those of the major livestock species, routinely applying the most novel approaches such as genomic selection. The industry is now looking towards the future, and the next 10 years are likely to be dominated by the incorporation of genome editing into breeding programmes. Genome editing is the perfect complement to traditional selection, and their integration is expected to deliver large benefits in animal welfare and sustainability.

## **CRIOBIOLOGIA DEL SEME PER LA CONSERVAZIONE DEGLI STOCK ITTICI E MANTENIMENTO DELLA VARIABILITÀ GENETICA**

Foglio L.<sup>1</sup>, Bornaghi V.<sup>1</sup>, Proietti L.<sup>1</sup>, Vanni R.<sup>1</sup>, Aidos L.<sup>2</sup>, Minerva, F.<sup>2</sup>, Cialini C.<sup>2</sup>, Mirra G.<sup>3</sup>, Modena S.<sup>2</sup>, Di Giancamillo A.<sup>4</sup>, Parati K.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Istituto Sperimentale Italiano “Lazzaro Spallanzani”, Rivolta d’Adda, Italy;* <sup>2</sup>*Department of Veterinary Medicine and Animal Science, University of Milan, Lodi, Italy;* <sup>3</sup>*Department of Comparative Biomedicine and Food Science, University of Padua, Padua, Italy;* <sup>4</sup>*Department of Biomedical Sciences for Health, University of Milan, Milan, Italy.*

La criobiologia è la branca della biologia che analizza il funzionamento degli organismi viventi, degli organi, dei tessuti e delle cellule a basse temperature. Come noto, la crioconservazione del materiale seminale è una delle procedure più importanti nello sviluppo delle biotecnologie per la riproduzione assistita. La “crioresistenza” degli spermatozoi varia a seconda delle loro caratteristiche specifiche, quali dimensione, forma e composizione lipidica. Pertanto, è impossibile sviluppare una procedura di congelamento standardizzata per le diverse specie di animali. Durante il congelamento, la diluizione del materiale seminale in extender addizionati con sostanze crioprotettive penetranti, combinata con una discesa termica ottimizzata, favorisce l’inizio della nucleazione del ghiaccio preferenzialmente nel compartimento extracellulare. La presenza di nuclei cristallini extracellulari richiama l’acqua libera dal citoplasma, inducendo una graduale disidratazione. In tal modo, il modesto quantitativo residuo di acqua libera intracellulare può formare solo piccoli cristalli non letali per le cellule. Le tecniche di crioconservazione del seme permettono di mantenere gli spermatozoi vitali per un periodo di tempo indefinito grazie alla conservazione alla temperatura di -196 °C (in azoto liquido).

Allo stato attuale delle conoscenze, nel settore dei pesci, il seme è il principale materiale genetico aploide che può essere crioconservato in opportune strutture chiamate criobanche.

Per le specie ittiche che si riproducono con la fecondazione artificiale la crioconservazione del materiale seminale offre notevoli vantaggi sia in termini di gestione della riproduzione sia per quanto riguarda la conservazione della risorsa genetica.

L’utilizzo di seme congelato garantisce una costante fornitura alle avannotterie, consentendone un utilizzo ottimale in fase di produzione. Inoltre, gli schemi di accoppiamento risultano indipendenti dalla durata del periodo di maturazione maschio/femmina. Infine, viene facilitato il trasporto di gameti anziché di riproduttori tra i vari siti di riproduzione.

La criobanca del seme dà la possibilità di preservare linee selezionate geneticamente o stock da proteggere da epidemie e deriva genetica. Consente di preservare il pool genetico dei selvatici originali per scopi conservazionistici, per la tutela di specie in via d’estinzione o in caso di forte domesticazione ed è uno strumento essenziale per sviluppare programmi di selezione e miglioramento genetico.

Diversi studi riportati in letteratura hanno dimostrato che il seme crioconservato produce larve di qualità pressoché identica a quelle derivanti con metodo tradizionale da seme fresco, sia in termini di sviluppo scheletrico sia in termini di biometrie, analisi istologiche e istometriche. L’esperienza maturata dall’Istituto Spallanzani in termini di sviluppo di protocolli di crioconservazione del materiale seminale di trota (trota marmorata, *Salmo marmoratus* e trota macrostigma, *Salmo cettii*) per la tutela di queste due specie in via d’estinzione, supporta tali risultati.

Seppur siano comunque necessarie importanti azioni politiche per la tutela degli habitat della specie, la creazione di una criobanca con un adeguato protocollo di crioconservazione risulta uno strumento utile nei programmi di ripopolamento e conservazione degli stock ittici e mantenimento della variabilità genetica.

## SELECTIVE BREEDING TO INCREASE DISEASE RESISTANCE AND FISH WELFARE: OUTPUTS FROM THE PERFORMFISH & FUTUREEUAQUA PROJECTS

Tsigenopoulos C.S.

*Institute of Marine Biology, Biotechnology and Aquaculture, Hellenic Centre for Marine Research (HCMR) Crete, Greece*  
E-mail: tsigeno@hcmr.gr

It is generally acknowledged that a preventive approach to disease management is far better than being obliged to respond to an outbreak once it has occurred. Selective breeding has recently been adopted in aquaculture to assist vaccines and new high-quality and/or functional feeds as a preventative approach in contrast to the reactive approach which may implement the use of antibiotics or chemicals aimed at removing pathogens. In some species, costs associated with disease prevention and treatment are now emerging as the biggest production expenditure exceeding the share of feed expenses. Selective breeding is nowadays accepted to be the principal approach to significantly amplify the aquaculture production and the quality of aquaculture products. Furthermore, in the last decade, the reduction in genome sequencing cost has initiated the application of SNP genotyping in aquaculture which also led to the development of high-throughput SNP arrays in prized farmed species.

In PerformFISH, we developed, validated and implemented a SNP genotyping tool to assess, among others, genomic variation for disease resistance and robustness in European sea bass and gilthead sea bream. Big scale trials for parasites' resistance with cohabitation in heavily infected environments were conducted with juveniles originating from a commercial breeding program in open-sea cages in Greece (for the copepod *Lernanthropus kroyeri* and the monogenean *Diplectanum aequans*). Additionally, indoor experiments were performed in France (*V. harveyi* injected in sea bass) and in Italy (infection by immersion with the reassortant viral nervous necrosis VNN strain in sea bream larvae).

In FutureEUAqua, the main objectives aimed to assess, validate and demonstrate the readiness level of the current aquaculture breeding programs to respond to the future challenges of increased need for utilization of alternative sources in feeds, the need for resilience in the face of climate change, and the sustained and increased animal welfare through robustness and disease resistance. Genotype-by-Feed evaluations for growth, fillet fat content and survival were performed in sea bass and sea bream using a new plant-based diet formulation. Last, the validation of selection against VNN was implemented for improved robustness and production traits in sea bass.

### Acknowledgements

The above studies received funding from the EU H2020Projects **PerformFISH**, (Grant agreement no. 727610, 2017-2022) and **FutureEUAqua** (Proposal no: SEP-210482810, 2018-2023).



## OUTPUTS OF SUPERTROUT PROJECT (IMPROVING SUSTAINABILITY AND PERFORMANCE OF AQUACULTURE FARMING SYSTEM: BREEDING FOR LACTOCOCCOSIS RESISTANCE IN RAINBOW TROUT)

Colussi S.<sup>1</sup>, Prearo M.<sup>1</sup>, Pastorino P.<sup>1</sup>, Martelli W.<sup>1</sup>, Ru G.<sup>1</sup>, Altinok I.<sup>2</sup>, Ozturk R.C.<sup>2</sup>, Ture M.<sup>3</sup>, Kotzamanidis C.<sup>4</sup>, Bitchava K.<sup>5</sup>, Andigoni M.<sup>6</sup>, Vela A.I.<sup>7</sup>, Fernández-Garayzabal J.F.<sup>7</sup>, Blanco M.M.<sup>7</sup>, Volpatti D.<sup>8</sup>, Khalil S.M.I.<sup>8</sup>, Saccà E., Fariano L.<sup>9</sup>, Sicuro B.<sup>10</sup>, Acutis P.L.<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Piemonte, Liguria and Valle d'Aosta, Torino; <sup>2</sup>Karadeniz Technical University, Turkiye; <sup>3</sup>Central Fisheries Research Institute (SUMAE), Turkiye; <sup>4</sup>Veterinary Research Institute, ELGO-DIMITRA, Greece; <sup>5</sup>School of Animal Biosciences, Agricultural University of Athens, Greece; <sup>6</sup>Laboratory of Biological Chemistry, Medical School, Aristotle University of Thessaloniki, Greece; <sup>7</sup>VISAVET and Department of Animal Health, Universidad Complutense de Madrid, Spain; <sup>8</sup>University of Udine, Department of Agricultural, Food, Environmental and Animal Sciences, Italy; <sup>9</sup>Azienda Agricola Canali Cavour, Italy; <sup>10</sup>University of Turin, Department of Veterinary Sciences, Italy.

SUPERTROUT is a project funded in the context of PRIMA (Partnership for Research and Innovation in the Mediterranean Area) programme. The goal of SUPERTROUT is to improve sustainability and profitability of small-scale farming systems facing lactococcosis in rainbow trout by applying an innovative strategy focussed primarily on the selection of genetic/genomic resistant fish and the development of a recombinant subunit-protein based vaccine. The main results obtained until now show a high prevalence in the Mediterranean area of *Lactococcus petauri* previously identified as *Lactococcus garvieae*, indicating that lactococcosis could be sustained by both bacterial species, apparently inducing the same symptoms. Interestingly, it has been demonstrated that conventional biochemical and biomolecular diagnostic techniques, usually applied, are not efficient for species discrimination. Thus, a new method based on the amplification of the ITS 16S-23S region was developed (Stoppani et al., 2023). Hemolysins and capsule have been studied as virulence factors, showing differences related to the presence of hemolysin 3 in the two species. Antimicrobial resistance was assessed by testing a panel of 12 antibiotics with disc diffusion test and e-test, while the presence of antimicrobial resistance genes (ARGs) was also examined. Overall, antimicrobial susceptibility tests indicate that 93.8% of the isolates are resistant to oxolinic acid, followed by flumequine (91.3%), streptomycin (88.8%), kanamycin (72.5%), and neomycin (66.3%). The study of the genetic of the host, focussing on MHC class IIB gene, is ongoing, but preliminary results based on different outbreaks selected in the countries involved in the project, showed a few statistically significant polymorphisms associated with trout resistance to lactococcosis. Host immune response has been studied in the Italian natural outbreaks and differences in head kidney expression of *IL-1 $\beta$* , *IL-8*, *IL-10*, *TCR- $\beta$* , *MHC-II*, *IgT* have been reported (Khalil et al., 2023a). Moreover, in symptomatic fish blood lymphocytes, serum antiprotease and peroxidase activity were lower than in asymptomatic fish, while thrombocytes were higher (Khalil et al., 2023b). The development of the recombinant subunit-protein vaccine is being carried out using the reverse vaccinology approach and different epitope targets able to induce immunogenic responses have been predicted to be used for vaccine production using plasmids. Matings of broodstock that had been genetically selected according to specific haplotypes of the MHC class IIB gene were evaluated for their reproductive performances using a factorial design. It was shown that gametes with similar MHC genetics produce offspring with a higher survival rate and lower larval deformities. The results obtained until now are promising for the management of the outbreaks, mainly for the possibility of having a specific etiological diagnosis and applying the proper control measures.

**References:** Stoppani, N.; Colussi, S.; Pastorino, P.; Prearo, M.; Sciuto, S.; Altinok, I.; Öztürk, R.Ç.; Ture, M.; Vela, A.I.; Blanco, M.d.M.; Kotzamanidis, C.; Bitchava, K.; Malousi, A.; Fariano, L.; Volpatti, D.; Acutis, P.L.; Fernández-Garayzabal, J.F. 16S-23S rRNA Internal Transcribed Spacer Region (ITS) Sequencing: A Potential Molecular Diagnostic Tool for Differentiating *Lactococcus garvieae* and *Lactococcus petauri*. *Microorganisms* 2023, *11*, 1320.

Khalil, S.M.I., Saccà E., Galeotti M., Sciuto S., Stoppani N., Acutis PL, Öztürk RC, Kotzamanidis C, Blanco MM, Fariano L, Prearo M, Colussi S, & Volpatti D. (2023a). In field study on immune-genes expression during a lactococcosis outbreak in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 574: 1-9.

Khalil SMI, Bulfon C, Galeotti M, Acutis PL, Altinok I, Kotzamanidis C, Vela AI, Fariano L, Prearo M, Colussi S, Volpatti D. (2023b) Immune profiling of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to *Lactococcus garvieae*: Evidence in asymptomatic versus symptomatic or vaccinated fish. *J Fish Dis.* 46(7):731-741.

## OUTPUT PROGETTI AQUAFAANG – FISHBOOST

Bargelloni L.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Biomedicina Comparata e Alimentazione, Università degli Studi di Padova

FISHBOOST (2014-2019) e AQUAFAANG (2019-2023) sono due progetti finanziati dall'Unione Europea rispettivamente nell'ambito del Settimo Programma Quadro e del Programma Horizon2020. FISHBOOST è stato completamente dedicato all'avanzamento degli schemi di selezione genetica in sei specie di pesci teleostei: salmone atlantico, trota iridea, branzino, orata, carpa e rombo. L'obiettivo era quello, in particolare per le specie in cui i programmi di selezione genetica sono meno sviluppati tecnicamente, di facilitare l'adozione di approcci avanzati quali la selezione genomica e la selezione assistita da marcatori per caratteri difficili da misurare quali la resistenza alle patologie infettive o l'efficienza nella conversione dell'alimento. Il progetto AQUAFAANG, che si concluderà il prossimo ottobre, ha invece come obiettivo quello di progredire nell'annotazione funzionale dei genomi delle stesse sei specie oggetto di studio in FISHBOOST. Con approcci metodologici avanzati (RNA-seq, ChIP-seq, ATAC-seq) sono state identificate a livello dell'intero genoma le regioni coinvolte nella regolazione dell'espressione dei geni di ciascuna specie, in diversi stadi di sviluppo, in tessuti differenti, con particolare attenzione per i geni coinvolti nella risposta immunitaria alle infezioni.

Per il progetto FISHBOOST verrà presentato come esempio uno studio condotto nell'orata rivolto alla stima dell'ereditabilità della resistenza alla fotobatteriosi. Approssimativamente 1200 orate di taglia compresa tra 3 e 5 gr (circa 120 dalla schiusa) sono state infettate sperimentalmente con un ceppo altamente virulento di *Photobacterium damsela piscicida* (Phdp, 249/ITT/99) mediante inoculo per via intramuscolare. Gli animali infettati sono stati tenuti in osservazione per 18 giorni, registrando una mortalità cumulativa del 36,5%. Per tutti gli animali (morti e sopravvissuti, includendo anche la generazione parentale) è stato raccolto un campione di pinna, da cui è stato estratto il DNA per le analisi genetiche. Utilizzando una metodica di genotipizzazione mediante sequenziamento (2bRAD) sono stati analizzati 28.330 polimorfismi a singolo nucleotide (SNP). Dai dati ottenuti è stato possibile ricostruire a posteriori le famiglie presenti nell'esperimento e stimare l'ereditabilità della resistenza (sopravvivenza) che risulta essere moderata-media ( $h^2=0,30$ ). Utilizzando tutti i marcatori variabili si è inoltre osservato che un approccio basato sulla selezione genomica è significativamente più accurato (+20% di accuratezza) rispetto ad uno tradizionale. Infine, mediante un'analisi di associazione è stato identificato un locus genico che contribuisce a circa il 16% della componente genetica della resistenza alla malattia.

Per il progetto AQUAFAANG verrà presentato il lavoro svolto per l'annotazione funzionale del genoma del branzino, in particolare degli elementi che regolano l'espressione della risposta immunitaria. Sono stati stimolati con *Vibrio anguillarum* inattivato, poly:IC, e PBS come controllo sia branzini naive in vivo, sia leucociti preparati da rene cefalico. A 24 ore dalla stimolazione sono stati estratti DNA e RNA per le analisi RNA-seq, ChIP-seq, ATAC-seq. Questo ha permesso di identificare i geni regolati dalla stimolazione che simula un'infezione batterica (*V. anguillarum* inattivato) e una virale (poly:IC), rispetto al controllo e le regioni che regolano tali geni. In aggiunta, sono stati analizzati mediante RNA-seq e ATAC-seq campioni di cervello e rene cefalico di 10 individui infettati con un ceppo virulento RGNNV e di 10 inoculati con PBS, in modo da identificare i geni coinvolti nella risposta ai betanodavirus e le regioni regolative associate. Infine, è stata condotta un'infezione sperimentale con lo stesso ceppo virale su circa 1100 branzini di taglia compresa tra 5 e 10 grammi, la mortalità è stata registrata per 29 giorni fino all'esaurirsi del fenomeno e gli animali morti e sopravvissuti all'infezione sono stati analizzati per determinare la presenza di loci genici associati alla resistenza, incrociando poi i dati genetici ottenuti con quelli di annotazione funzionale.

## **INDICE PRIMI AUTORI**

Abba	<i>Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, 154 Torino, Italia</i>	36
Asara	<i>Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna, Struttura Complessa Diagnostica di Cagliari, Oristano e Sassari</i>	37
Antuofermo	<i>Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Sassari</i>	21
Bargelloni	<i>Dipartimento di Biomedicina Comparata e Alimentazione, Università degli Studi di Padova</i>	66
Beraldo	<i>Dipartimento di Scienze Agroalimentari, Ambientali e Animali, Università degli Studi di Udine</i>	27
Bezzo	<i>Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, 154 Torino, Italia</i>	38
Bignami	<i>Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie (DIVEMET), Alma Mater Studiorum Università di Bologna, Ozzano Emilia (BO);</i>	39
Bondavalli	<i>Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino, Italia</i>	40,41,42
Buratin	<i>Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro (PD)</i>	16
Capparucci	<i>Dipartimento di Scienze Chimiche, Biologiche, Farmaceutiche ed Ambientali, Università di Messina</i>	43
Carella	<i>Dipartimento di Biologia, Università degli studi di Napoli Federico II, Via Cinthia, Complesso di MSA, Napoli, Italia</i>	44,45
Clemente	<i>Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Brescia</i>	31
Colussi	<i>Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino (TO)</i>	22,46,65
Corradini	<i>Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana "M: Aleandri"</i>	30
Cortinovis	<i>Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro (PD)</i>	23,26
Costa	<i>Azienda Ospedaliero Universitaria Policlinico "G. Rodolico-San Marco" - Catania</i>	47
De Benedetto	<i>Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Messina</i>	48
De Vos	<i>Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie (DIVEMET), Alma Mater Studiorum Università di Bologna, Ozzano Emilia (BO)</i>	49
Errani	<i>Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie - Università di Bologna</i>	15
Esposito	<i>Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino (TO)</i>	32
Faggion	<i>Department of Comparative Biomedicine and Food Science, University of Padova, Legnaro (Padova)</i>	61

Franzago	<i>Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro (PD)</i>	50
Foglio	<i>Istituto Sperimentale Italiano "Lazzaro Spallanzani", Rivolta d'Adda, Italy</i>	63
Gabetti	<i>Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino (TO)</i>	51
Gustinelli	<i>Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie (DIVEMET), Alma Mater Studiorum Università di Bologna, Ozzano Emilia (BO)</i>	28
Iaria	<i>Dipartimento di Scienze Chimiche, Biologiche, Farmaceutiche ed Ambientali, Università di Messina (ChiBioFarAm)</i>	52,53
Khalil	<i>Department of Agricultural, Food, Environmental and Animal Sciences (DI4A), University of Udine, Italy</i>	25
Luci	<i>Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie (DIVEMET), Alma Mater Studiorum Università di Bologna, Ozzano Emilia (BO)</i>	54
Lunardelli	<i>Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro (PD)</i>	55
Lucon Xiccato	<i>Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro (PD)</i>	33
Maganzaa	<i>Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino (TO)</i>	56
Marsella	<i>Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro (PD)</i>	17
Polinas	<i>Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Sassari, 07100 Sassari, Italia</i>	18
Pastorino	<i>Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino</i>	24,57
Pirollo	<i>Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie (DIVEMET), Alma Mater Studiorum Università di Bologna, Ozzano Emilia (BO);</i>	29
Prearo	<i>Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle D'Aosta (IZSPLV)</i>	58,59
Pretto	<i>Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro (PD) Dipartimento di Scienze Biologiche, Geologiche e Ambientali, Università degli Studi di Catania</i>	34
Robledo	<i>The Roslin Institute and Royal (Dick) School of Veterinary Studies, University of Edinburgh, Easter Bush Campus, UK</i>	62
Toffan	<i>Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro (PD)</i>	19
Tsigenopoulos	<i>Institute of Marine Biology, Biotechnology and Aquaculture, Hellenic Centre for Marine Research (HCMR) Crete, Greece</i>	64
Volpe	<i>Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Alma Mater Studiorum, Università di Bologna, Cesenatico (FC)</i>	20