

 **Interreg**
Italy - Croatia
AdriAquaNet



AdriaAquaNet

**Miglioramento,
Innovazione e
Sostenibilità
dell'Acquacoltura
dell'Adriatico**



**STRATEGIE
VACCINALI IN
AVANNOTTERIE
E ALLEVAMENTI
ITTICI MARINI**



AdriaAquaNet

**Miglioramento,
Innovazione e
Sostenibilità
dell'Acquacoltura
dell'Adriatico**



STRATEGIE VACCINALI IN AVANNOTTERIE E ALLEVAMENTI ITTICI MARINI

ZAGABRIA, 2022.
Istituto Veterinario Croato, Zagabria



Nome del progetto: Interreg Italy-Croatia “AdriAquaNet” – Enhancing Innovation and Sustainability in Adriatic Aquaculture

Priorità: Innovazione Blu

Durata: 01.01.2019. – 30.06.2022.

Coordinatore: Università di Udine, Italia

Dipartimento di Scienze AgroAlimentari, Ambientali e Animali

Contatto: Prof. Marco Galeotti

marco.galeotti@uniud.it

Titolo: Strategie vaccinali in avannotterie e allevamenti ittici marini

Editore: Istituto Veterinario Croato, Zagabria

Autori: Chiara Bulfon, Igor Cvitić, Marco Galeotti, Danijel Mejdandžić, Dražen Oraić, Valentina Pacorig, Donatella Volpatti, Lea Vrbančić, Ivana Giovanna Zupičić, Snježana Zrnčić

Editore: Marco Galeotti e Snježana Zrnčić

Design grafico: GENS94

Fotografie: Università di Udine, Istituto Veterinario Croato, Cromaris

Stampa: Printera Grupa

ISBN: 935-6836-28-9 (edizione cartacea)

935-6836-29-7 (edizione elettronica)

Il contenuto della presente pubblicazione è rilasciato sotto la sola responsabilità dei partner del progetto e non rispecchia necessariamente il parere o la posizione dell’Unione Europea

Contenuti

PREFAZIONE	7
1. INTRODUZIONE - Snježana Zrnčić e Marco Galeotti	9
2. IL SISTEMA IMMUNITARIO DELLA SPIGOLA (<i>DICENTRARCHUS LABRAX</i>) E DELL'ORATA (<i>SPARUS AURATA</i>) - Marco Galeotti e Donatella Volpatti	12
2.1. Introduzione.....	12
2.2. Gli organi e le cellule del sistema immunitario	13
2.2.1. Morfologia dei leucociti	14
2.3. Principali meccanismi di risposta immunitaria aspecifica	14
2.3.1. Complemento.....	14
2.3.2 Peptidi antimicrobici e lisozima.....	15
2.3.3. Fagocitosi e "burst" respiratorio	15
2.3.4. Citochine	15
2.4. Principali meccanismi di risposta immunitaria specifica.....	16
2.4.1. Linfociti T e B – immunoglobuline.....	16
2.4.2. Molecole MHC (Complesso Maggiore di Istocompatibilità) e altri immuno-recettori	17
3. PRINCIPALI AGENTI INFETTIVI PATOGENI	
DEL MAR ADRIATICO - Snježana Zrnčić	20
3.1. Vibriosi causata da <i>Vibrio anguillarum</i> - Dražen Oraić	21
3.1.1. Agente eziologico	21
3.1.2. Infezione e fattori ambientali	22
3.1.3. Aspetti clinici della malattia	22
3.1.4. Gestione della malattia	23
3.2. Vibriosi causata da <i>Vibrio harveyi</i> - Ivana Giovanna Zupičić	25
3.2.1. Agente eziologico	25
3.2.2. Infezione e fattori ambientali	26
3.2.3. Aspetti clinici della malattia	26
3.2.4. Gestione della malattia	27
3.3. Fotobatteriosi causata da <i>Photobacterium</i> <i>damselae</i> subsp. <i>piscicida</i> - Marco Galeotti, Chiara Bulfon e Valentina Pacorig	29
3.3.1. Agente eziologico	29
3.3.2. Infezione, patogenesi e fattori ambientali.....	30
3.3.3. Aspetti clinici ed anatomopatologici della malattia.....	31
3.3.4. Gestione della malattia	33

3.4. Tenacibaculosi causata da <i>Tenacibaculum maritimum</i> - Snježana Zrnčić e Lea Vrbančić	37
3.4.1. Agente eziologico	37
3.4.2. Infezione e fattori ambientali	38
3.4.3. Aspetti clinici della malattia	38
3.4.4. Gestione della malattia	39
4. VACCINAZIONE E STRATEGIE VACCINALI - Snježana Zrnčić e Dražen Oraić	41
4.1 Introduzione.....	41
4.1.1. Tipi di vaccini.....	41
4.1.2. Somministrazione del vaccino.....	42
4.2. Vaccini disponibili in commercio.....	44
4.3. La rivaccinazione in avannotteria - Dražen Oraić, Marco Galeotti e Danijel Mejdandžić	46
4.4. La rivaccinazione in gabbia - Snježana Zrnčić	50
4.4.1. Rivaccinazione per immersione - Snježana Zrnčić e Igor Cvitić	51
4.4.2. Rivaccinazione mediante iniezione - Dražen Oraić e Danijel Mejdandžić	55

Prefazione

AdriAquaNet (Enhancing Innovation and Sustainability in Adriatic Aquaculture) è un progetto Interreg Italia-Croazia V-A 2014-2020 che rientra nell'Asse prioritario 1 "Innovazione blu – Migliorare le condizioni di contesto per l'innovazione nei settori rilevanti della blue economy all'interno dell'area di cooperazione".

L'obiettivo principale del progetto è rafforzare l'acquacoltura sostenibile nel Mare Adriatico trasferendo le conoscenze avanzate e le nuove tecnologie direttamente alla filiera dell'acquacoltura, dalla gestione della produzione in azienda fino al mercato del prodotto trasformato. Il progetto è concepito per intervenire su tre aspetti principali della filiera:

1. Miglioramento delle procedure di allevamento attraverso formule e tecniche di alimentazione innovative per migliorare la qualità del pesce, rispettando l'ambiente e allo stesso tempo implementando la tecnologia per il risparmio energetico.
2. Implementazione di un nuovo approccio alla gestione della salute e del benessere attraverso la vaccinazione contro alcune malattie batteriche e l'applicazione di prodotti naturali a scopo terapeutico.
3. Sviluppo di linee guida per i consumatori, valutando la salubrità e la qualità del pesce, le proprietà sensoriali e nutrizionali e i benefici per la salute, presentando questi dati anche attraverso una campagna di marketing rivolta ai consumatori della regione adriatica.

Il manuale "Strategie di vaccinazione nelle avannotterrie e negli allevamenti ittici marini" è un documento destinato agli allevatori europei di spigole e orate, ai veterinari coinvolti nella gestione sanitaria della maricoltura adriatica, ai rappresentanti dell'industria farmaceutica e a tutte le altre parti interessate che si occupano della gestione della salute dei pesci. Il documento fornisce informazioni di base sul sistema immunitario di spigola e orata, consentendo ai lettori di comprendere l'importanza dell'immunoprofilassi nell'allevamento ittico e presenta una rassegna delle più importanti malattie batteriche dal punto di vista economico che colpiscono le specie menzionate, implementata da consigli pratici necessari durante l'attuazione della vaccinazione. Le attività e le ricerche realizzate nell'ambito del WP4 "R&I per migliorare la salute e la sostenibili-

tà in acquacoltura”, come la produzione del vaccino e le strategie di vaccinazione, sono spiegate in questo manuale.

Gli autori, partner di AdriaAquaNet, sono tra i massimi esperti nel campo della gestione della salute del pesce allevato in Italia e in Croazia. Essi sono stati supportati da esperti dell’allevamento ittico, anch’essi partner del progetto. Tutti gli autori sono riportati in ordine alfabetico:

- Chiara Bulfon** – Dipartimento di Scienze AgroAlimentari, Ambientali e Animali, Unità di Patologia Veterinaria, Università di Udine.
- Igor Cvitić** – Allevamento ittico Friskina, Spalato.
- Marco Galeotti** – Dipartimento di Scienze AgroAlimentari, Ambientali e Animali, Unità di Patologia Veterinaria, Università di Udine.
- Danijel Mejdandžić** – Allevamento ittico Cromaris.
- Dražen Oraić** – Istituto Veterinario Croato, Laboratorio di patologia ittica
- Valentina Pacorig** – Dipartimento di Scienze AgroAlimentari, Ambientali e Animali, Unità di Patologia Veterinaria, Università di Udine.
- Donatella Volpatti** – Dipartimento di Scienze AgroAlimentari, Ambientali e Animali, Unità di Patologia Veterinaria, Università di Udine.
- Lea Vrbančić** – Istituto Veterinario Croato, Laboratorio di patologia ittica.
- Ivana Giovanna** – Istituto Veterinario Croato, Laboratorio di patologia ittica.
- Snježana Zrnčić** – Istituto Veterinario Croato, Laboratorio di patologia ittica.

Un doveroso ringraziamento va all’Azienda Cromaris che, pur non coinvolta come partner nel progetto AdriaAquaNet, ha dato la sua gentile collaborazione nell’ambito della ricerca.

Snježana Zrnčić e Marco Galeotti

1. Introduzione

Snježana Zrnčić

Istituto Veterinario Croato, Laboratorio di patologia ittica

Marco Galeotti

Università di Udine, Dipartimento di Scienze AgroAlimentari, Ambientali e Animali

L'allevamento di spigola (*Dicentrarchus labrax*) e orata (*Sparus aurata*) costituisce un settore produttivo molto importante per l'area adriatica, sia lungo la costa italiana che croata. Attualmente, le malattie infettive rappresentano un collo di bottiglia nello sviluppo dell'acquacoltura (Fernandez Sanchez et al. 2021). Sebbene l'ambiente marino favorisca la sopravvivenza dei batteri al di fuori del loro ospite, nel bacino del Mediterraneo solo pochi di essi sono in grado di provocare malattie (Pujalte et al. 2003). Tra i batteri patogeni che causano perdite in spigole e orate allevate, i più frequenti, dannosi ed economicamente importanti sono *Vibrio anguillarum*, *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida* e l'emergente *Vibrio harveyi* (Mancuso 2014). Inoltre, le infezioni provocate da *Tenacibaculum* spp. sono considerate tra le malattie più importanti della spigola (Zrnčić and Pavlinec, 2020). Tuttavia, un focolaio di malattia infettiva di origine batterica non è necessariamente causato da un singolo agente patogeno, ma può derivare da un'interazione sinergica tra diversi ceppi batterici appartenenti a due o più taxa.

Un'infezione batterica che causa mortalità e perdite massive potrebbe essere mitigata dal trattamento dei pesci con sostanze chimiche e antibiotici (Soliman et al. 2019). Sebbene l'uso di antibiotici possa avere successo nella riduzione delle perdite, il loro impiego ripetuto è spesso associato a effetti potenzialmente negativi come la comparsa di antibiotico-resistenza e la permanenza di residui nell'ambiente marino e nei prodotti ittici.

Così come per altre specie di vertebrati, la vaccinazione è una componente chiave per allevare pesci sani e in modo sostenibile (Miccoli et al. 2019), ed è stata riconosciuta come metodo profilattico essenziale per la riduzione dell'uso di antibiotici nel settore dell'acquacoltura (Adams 2019). Infatti, l'aumento dell'incidenza di batteri resistenti agli antibiotici e dei rischi per la sicurezza alimentare potrebbe essere mitigato da strategie di vaccinazione che risultino economiche ed efficaci nel proteggere la salute dei pesci da vari agenti infettivi, garantendo un'acquacoltura rispettosa dell'ambiente e prodotti alimentari sicuri (AAC 2018). Questa pratica dovrebbe far parte di un programma di gestione sanitaria responsabile e dovrebbe essere accuratamente pianificata, ma è importante sottolineare che non può essere considerata

una soluzione rapida ai problemi sanitari di un allevamento ittico. Per ottenere risultati significativi, gli allevatori in collaborazione con esperti e veterinari dovrebbero definire uno specifico e adeguato programma vaccinale in modo da ottenere risultati soddisfacenti.

Alla luce del contesto sopra menzionato, il progetto AdriAquaNet è stato finalizzato al miglioramento della sostenibilità dell'acquacoltura marina adriatica e ha incluso la vaccinazione come misura promotrice della sostenibilità.

Per promuovere questa misura e facilitare l'uso dei vaccini negli allevamenti di spigole e orate, l'attività progettuale si è sviluppata seguendo due tematiche:

- i. produzione di vaccini autologhi contro *Vibrio harveyi* e *Tenacibaculum maritimum* e verifica della loro efficacia in laboratorio e in campo
- i. preparazione e pubblicazione del manuale "Strategie vaccinali per avannotterie e allevamenti ittici"

La pubblicazione "Strategie vaccinali per avannotterie e allevamenti ittici" è stata concepita come compendio delle informazioni più importanti riguardanti il ruolo della vaccinazione nella gestione delle malattie batteriche nell'acquacoltura marina adriatica e si compone dei seguenti capitoli:

- Capitolo 2: "Il sistema immunitario della spigola (*Dicentrarchus labrax*) e dell'orate (*Sparus aurata*)", fornisce informazioni di base sul sistema immunitario di spigola e orata, e spiega quali organi sono deputati alla protezione contro i patogeni, quali sono i meccanismi di difesa e come i pesci traggono beneficio dalla somministrazione di un vaccino;
- Capitolo 3: "Principali patogeni infettivi nel mare Adriatico", tratta i patogeni batterici più impattanti per l'allevamento di spigola e orata, fornendo informazioni di base sulle specie batteriche, i meccanismi di infezione, le condizioni ecologiche per lo sviluppo della malattia, gli aspetti clinici della malattia e le misure per la gestione della malattia;
- Capitolo 4: "Vaccinazione e strategie vaccinali" informa i lettori sui diversi vaccini disponibili in commercio per spigola e orata, insegnando come preparare il piano di vaccinazione e come eseguire la vaccinazione in avannotteria e la rivaccinazione dei pesci prima del trasferimento in gabbia, sia per immersione che per iniezione.

La speranza è che questo compendio possa aiutare i veterinari specialisti, gli allevatori e i consulenti a definire un approccio vaccinale efficiente, e a selezionare il vaccino ottimale, al fine di prevenire con successo la diffusione delle malattie batteriche negli allevamenti ittici localizzati nell'area adriatica. Tale risultato contribuirà alla sostenibilità dell'acquacoltura nel Mar Adriatico, alla salute dei consumatori e alla tutela dell'ambiente.

Riferimenti bibliografici

- Adams, A. (2019). Progress, challenges and opportunities in fish vaccine development. *Fish & Shellfish Immunology*, 90, 210-214.
- Aquaculture Advisory Council (AAC). (2018). Relevance of the availability of effective vaccines in aquaculture. Position Paper – February 2018. pp 9.
- Fernandez Sanchez, J.L, A. Le Breton, E. Brun, N. Vendramin, G. Spiliopoulos, D. Furones, B. Basurco. (2022). Assessing the economic impact of diseases in Mediterranean grow-out farms culturing European sea bass. *Aquaculture*, 547, 737530.
- Mancuso M. (2014). Emerging bacterial pathologies in Mediterranean mariculture. *Journal of Aquaculture and Research*,1, 1-2.
- Miccoli, A., P.R. Saraceni, G. Scapigliati. (2019). Vaccines and immune protection of principal Mediterranean marine fish species. *Fish and Shellfish Immunology*, 94, 800-809.
- Pujalte, M.J., A. Sitja-Bobadilla, P. Alvarez-Pellitero, E. Garayi. (2003). Carriage of potentially fish-pathogenic bacteria in *Sparus aurata* cultured in Mediterranean fish farms. *Diseases of Aquatic Organisms*, 54, 119-126.
- Soliman, W. S., R.M. Shaapan, L.A. Mohamed, S. Gayed. (2019). Recent biocontrol measures for fish bacterial diseases, in particular to probiotics, bio-encapsulated vaccines, and phage therapy. *Open veterinary journal*, 9, 190–195.
- Zrnčić, S., Ž. Pavlinec. (2020). Introduction to bacterial diseases. In: Zrnčić, S. (Ed.), Diagnostic manual for the main pathogens in European seabass and gilthead seabream aquaculture. *Options Mediterraneennes Serie B, Etudes et Recherches* n. 75. CIHEAM, Zaragoza, pp. 63-66.

2. Il sistema immunitario della spigola (*Dicentrarchus labrax*) e dell'orata (*Sparus aurata*)

Marco Galeotti e Donatella Volpatti

Università di Udine, Dipartimento di Scienze AgroAlimentari, Ambientali e Animali

2.1. Introduzione

La spigola (*Dicentrarchus labrax*) e l'orata (*Sparus aurata*) sono le specie ittiche di acqua marina più importanti in ambito mediterraneo (<https://feap.info/wp-content/uploads/2022/03/production-report>). La loro rilevanza commerciale ha stimolato l'interesse dei ricercatori verso aspetti riguardanti la risposta immunitaria e la protezione dalle malattie. Per entrambe le specie sono stati pubblicati dati relativi al genoma (Tine et al. 2014; Pauletto et al. 2018) e sono disponibili alcuni anticorpi per la marcatura di immunoglobuline e popolazioni leucocitarie (Tab. 1).

Consultando la letteratura scientifica (banche dati SCOPUS e WOS) emerge che l'orata è stata prevalentemente oggetto di indagini immunologiche da parte di ricercatori spagnoli, mentre la spigola è stata prevalentemente studiata da ricercatori italiani per quanto riguarda gli aspetti immunitari. Il livello di conoscenza raggiunto su morfologia e funzione del sistema immunitario in queste due specie è ormai molto alto e certamente paragonabile a quello relativo a specie di acqua dolce ancora più rilevanti, per motivi economici (salmonidi/ciprinidi) o sperimentali (zebrafish). In questo capitolo sono stati sintetizzati, in modo aggiornato, i principali aspetti morfo-funzionali che riguardano la risposta immunitaria delle due specie ittiche oggetto di trattazione.

Tabella 1. Anticorpi anti immunoglobuline/leucociti per le specie orata e spigola, utilizzabili a scopo diagnostico e di ricerca.

Specie target	Orata	Spigola
Anticorpi per immunoglobuline	<ul style="list-style-type: none">• IgM https://aquaticdiagnostics.com/• IgT https://ximbio.com/reagent/153529/anti-igt-z55f8c3 https://bocascientific.com/	<ul style="list-style-type: none">• IgM (DLIg3 mAb e pAb)• IgT pAb• IgD pAb Ref. Prof. Scapigliati - Università della Tuscia <ul style="list-style-type: none">• IgM mAb https://aquaticdiagnostics.com/
Anticorpi per leucociti	<ul style="list-style-type: none">• G7 – specifico per granulociti acidofili• Macrophage colony-stimulating factor receptor Ref. Prof. Mulero- Università di Murcia	<ul style="list-style-type: none">• Timociti (DTL15 mAb)• Linfociti T CD3 pAb Ref. Prof. Scapigliati- Università della Tuscia

2.2. Gli organi e le cellule del sistema immunitario

Come tutti i vertebrati, i pesci possiedono una risposta immunitaria umorale e cellulare, sia innata sia adattativa, con alcune differenze rispetto ai mammiferi, soprattutto in termini di efficienza della risposta stessa. In linea generale, possiamo dire che i pesci contano soprattutto sui meccanismi di immunità innata (non specifica) per contrastare gli agenti infettivi. Gli organi principali del sistema linfo-emopoietico sono il timo, il rene anteriore e la milza (Bjørngen and Koppang 2021). Il timo è un organo pari, localizzato nella camera branchiale, ed è principalmente responsabile della produzione dei linfociti T. Il rene anteriore, posto in zona cefalica al di sotto della colonna vertebrale, può essere funzionalmente assimilato al midollo osseo dei mammiferi, ed è popolato da forme immature e mature di cellule fagocitarie (monociti e granulociti) con attitudine alla presentazione dell'antigene, linfociti, melano-macrofagi. In questa sede ha luogo la sintesi degli anticorpi (IgM). La milza è un organo linfoide secondario ed è posto nella cavità celomatica. Essa contiene linfociti e macrofagi, coinvolti nella "cattura" degli antigeni. Gli antigeni processati a livello di tale organo sono considerati promotori dello sviluppo della memoria immunologica. In base a studi di ontogenesi condotti negli anni '90 è stato evidenziato che nelle larve di orata e spigola la comparsa degli organi linfatici è già completa 25-30 giorni dopo la schiusa (Josefsson and Tatner 1993; Quesada et al. 1994; Abelli et al. 1996; Galeotti and Beraldo, osservazioni personali).

Nei pesci viene attribuita molta importanza anche agli organi responsabili di immunità mucosale. Essi costituiscono una barriera fisica che separa il pesce dall'ambiente esterno e vengono considerati quali siti immunologicamente attivi nella protezione contro i patogeni. I tessuti linfoidi associati alle mucose vengono complessivamente definiti con l'acronimo MALT. Più in dettaglio, si fa riferimento al tessuto linfoide associato all'intestino (GALT), alla cute (SALT), alle branchie (GIALT), alla naso-faringe (NALT) (Gomez et al. 2013; Salinas 2015). Anche questi organi sono popolati da linfociti T e B, granulociti, monociti-macrofagi, cellule granulari eosinofile (EGCs), distribuiti tuttavia in modo meno organizzato rispetto a quanto osservato negli organi linfatici non mucosali. L'immunità associata alle mucose attualmente è oggetto di numerosi studi anche in orata e spigola, perché è la prima ad essere coinvolta nei processi difensivi, e la sua attività viene modulata e "allenata" dal continuo contatto con il microbiota (batteri naturalmente associati alle mucose) (Panteli et al. 2020; Picchietti et al. 2021).

2.2.1. Morfologia dei leucociti

Di seguito viene riportata una tavola illustrante la morfologia delle principali popolazioni leucocitarie del sangue periferico in spigola e orata (Fig.1).

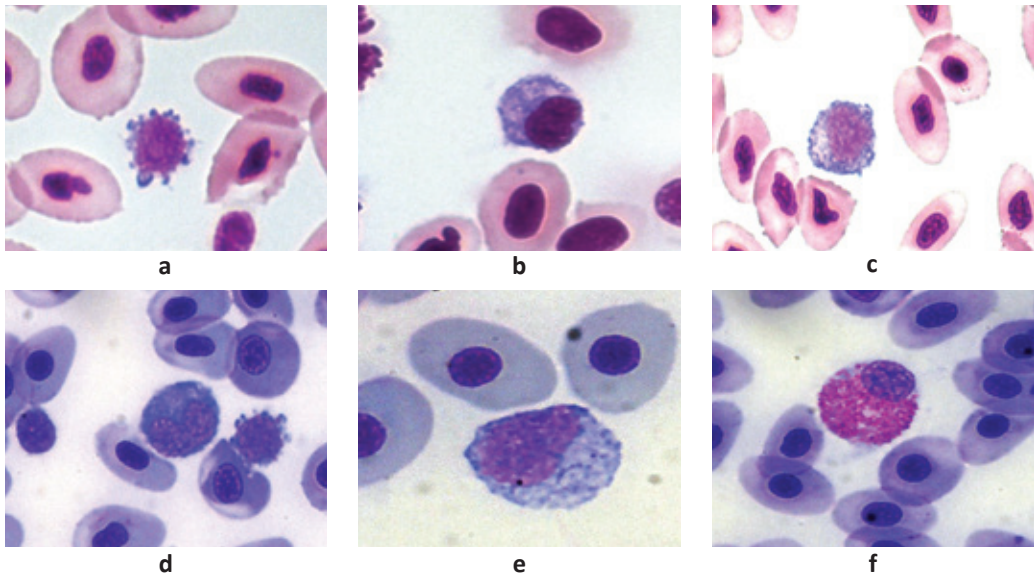


Figura 1. Strisci ematici colorati con Giemsa. Spigola: linfocita (a), monocita (b), granulocita neutrofilo (c). Orata: monocita e linfocita (d), granulocita neutrofilo (e), granulocita acidofilo (f).

2.3. Principali meccanismi di risposta immunitaria aspecifica

2.3.1. Complemento

Il complemento è un sistema costituito da più di 35 proteine che ricoprono un ruolo fondamentale nell'immunità innata e sono responsabili del riconoscimento delle particelle microbiche e della loro conseguente fagocitosi o lisi cellulare. Il sistema del complemento può essere attivato attraverso tre vie: la via classica (CCP, via anticorpo-dipendente), la via alternativa (ACP, via anticorpo indipendente) e la via delle lectine (LCP). I teleostei possiedono un efficiente sistema del complemento (Boshra and Sunyer 2006) che è stato però caratterizzato in un numero limitato di specie ittiche, fra le quali l'orata (Sunyer et al. 1997). Una delle proprietà più interessanti del complemento dei pesci teleostei è stata riscontrata in alcune sue specifiche componenti (C3 e fattore B), presenti in isoforme multiple (forme simili che differiscono per piccole differenze strutturali) codificate da geni differenti, in grado di ampliare notevolmente lo spettro dei patogeni riconosciuti (Zarkardis et al. 2013). Diverse isoforme di C3 sono state identificate sia nella spigola che nell'orata (Mauri et al. 2011).

2.3.2. Peptidi antimicrobici e lisozima

I peptidi antimicrobici (AMPs) sono molecole di piccole dimensioni (12-50 aminoacidi) e costituiscono una parte importante del sistema di difesa innato dei pesci, agendo con funzioni antimicrobiche e immunomodulanti. Nel corso degli ultimi venti anni l'espressione genica e la presenza di queste molecole, così come il loro ruolo biologico, sono stati studiati da vari ricercatori anche in spigola e orata (Cuesta et al. 2008; Terova et al. 2009; Barroso et al. 2020, 2021; Valero et al. 2020; Cervera et al. 2022). I peptidi ad oggi segnalati in queste specie ittiche sono circa una decina e appartengono ai seguenti gruppi: beta-defensine, NK-lisine, piscidine, epcidina, H1-H4 istoni, dicentracina (specifico della spigola). Essi sono sintetizzati in varie sedi organiche (mucose, fegato, organi linfatici), e anche nel citoplasma di cellule infiammatorie circolanti quali monociti-macrofagi, granulociti acidofili e cellule granulari eosinofile (EGCs). La loro espressione e sintesi viene opportunamente modulata nel corso dell'ontogenesi o quando il pesce risulta esposto ad infezioni virali, batteriche e parassitarie. Una importante azione antibatterica aspecifica viene svolta nei pesci anche dal lisozima. Si tratta di una molecola enzimatica ad azione litica, particolarmente attiva nei confronti dei germi Gram positivi, sintetizzata dalle cellule epatiche e dai macrofagi (Saurabh and Sahoo 2008; Li et al. 2021). Numerosi studi condotti in spigola e orata hanno valutato l'attività del lisozima in matrici biologiche quali siero e muco, al fine di quantificare l'efficienza di questo parametro di immunità innata umorale in soggetti sottoposti a diete sperimentali, trattamenti di vaccinazione/immunostimolazione, o in corso di malattia (Buonocore et al. 2014; Carbone et al. 2016).

2.3.3. Fagocitosi e “burst” respiratorio

In orata e spigola la fagocitosi è il principale meccanismo di immunità cellulo-mediata, finalizzato alla internalizzazione e inattivazione di microrganismi, detriti cellulari o altro materiale estraneo (Esteban 1997). È un processo di immunità aspecifica, ma può eventualmente essere favorito dall'intervento di anticorpi opsonizzanti specifici per il patogeno. La membrana dei fagociti presenta recettori per molecole espresse a loro volta sulla superficie delle cellule *target*. L'uccisione dei microrganismi fagocitati avviene grazie al rilascio di enzimi, di prodotti reattivi dell'ossigeno (ROS) e dell'azoto (NO). In particolare il rilascio dei ROS viene definito “burst” respiratorio e può essere quantificato in laboratorio quale parametro di efficienza dell'immunità aspecifica (Galeotti et al. 2013).

2.3.4. Citochine

Una fondamentale classe di molecole coinvolte nel sistema immunitario è quella delle citochine, che svolgono un ruolo centrale nei sistemi di difesa sia innato sia acquisito e nella regolazione della risposta infiammatoria. Gli studi condotti, specialmente sui Teleostei, hanno confermato la presenza nei pesci di omologhi funzionali delle ci-

tochine di mammifero (Secombes et al. 1996; Buchmann 2014). Numerosi studi sono stati dedicati alla caratterizzazione di queste molecole e al loro ruolo durante la risposta infiammatoria, in svariate condizioni sia in orata sia nella spigola (Scapigliati et al. 2001; Castellana et al. 2013; Roman et al. 2013; Cordero et al. 2016; Reyes-Lopez et al. 2018; Miccoli et al. 2021).

2.4. Principali meccanismi di risposta immunitaria specifica

2.4.1. Linfociti T e B – immunoglobuline

I principali protagonisti del sistema immunitario specifico dei pesci sono i linfociti (T e B) e le immunoglobuline (Ig). I pesci sono i primi vertebrati, nella scala evolutiva, a possedere questi componenti, che risultano un punto di passaggio sostanziale tra immunità innata e adattativa. In termini cronologici questo fenomeno è avvenuto circa 450 milioni di anni fa (Tort 2003; Bohem et al. 2012; Sunyer 2013; Flajnik et al. 2018).

Molte indagini scientifiche hanno evidenziato che il sistema immunitario adattativo dei pesci risulta meno efficiente rispetto a quello dei mammiferi. Nei teleostei, rispetto ai mammiferi, non si verifica lo “switch isotipico” degli anticorpi dalla classe IgM alla classe IgG, e non sono presenti linfonodi e follicoli linfatici con centri germinativi.

L'ontogenesi dei linfociti è stata studiata nella spigola da Dos Santos et al. (2000) e da Rombout et al. (2005), dimostrando che le cellule T nei principali organi linfatici appaiono dai 28 ai 45 giorni dopo la schiusa, mentre le cellule B appaiono a partire da dai 45 ai 90 giorni dopo la schiusa. Livelli di linfociti T e B assimilabili a quelli dell'adulto vengono raggiunti verso i 137-145 giorni dalla schiusa, suggerendo che la spigola è immunologicamente “matura” a partire da questo stadio.

Per quanto riguarda il trasferimento di anticorpi materni (IgM) alle uova e all'embrione, esso è stato dimostrato in orata e spigola grazie ai lavori di Breuil et al. (1997), Picchietti et al. (2004), Hanif et al. (2005). Sulla base di tali osservazioni è possibile proporre piani di vaccinazione dei riproduttori di queste specie ittiche al fine di trasferire protezione contro i patogeni, mediata da anticorpi specifici, anche alla progenie. In orata e spigola la classe anticorpale più significativa è quella delle IgM, molecole tetrameriche costituite da 4 unità monomeriche legate tra loro da catene J. Esse rappresentano gli anticorpi più abbondanti nel siero, mentre la loro concentrazione nel muco cutaneo e intestinale è molto bassa. Sono secrete principalmente dalle plasmacellule del rene anteriore. Dopo la vaccinazione si osserva un aumento sostanziale del titolo di IgM nel siero, processo che risulta temperatura dipendente. Recentemente in orata e spigola sono stati individuati anche anticorpi della classe IgT (Piazzon et al. 2016; Buonocore et al. 2017), similmente a quanto già osservato in trota iridea e zebrafish. Le IgD sono state identificate solamente in spigola. Le IgT, vista la localizzazione delle plasmacellule

secernenti (cute/intestino/branchie), sono considerate parte dell'immunità mucosale, con un ruolo simile alle IgA dei mammiferi. In generale le funzioni degli anticorpi dei pesci sono assimilabili a quelle proprie dei mammiferi.

2.4.2. Molecole MHC (Complesso Maggiore di Istocompatibilità) e altri immuno-recettori

Le molecole MHC di classe I e II sono proteine espresse sulla membrana cellulare, in grado di presentare peptidi antigenici (Wegner 2008) ai linfociti T ed innescare una risposta immunitaria difensiva. La loro struttura è assimilabile a quella dei mammiferi e comprende due sub-unità α e β (Buoncore et al. 2007). I geni che codificano tali proteine, già identificati in più di trenta specie di teleostei (Dixon et al. 2001; Buoncore et al. 2007), sono dotati di un notevole polimorfismo, su cui si basa la variabilità della resistenza individuale alle malattie. Come per altri teleostei, sia nella spigola (Buoncore et al. 2007; Pinto et al. 2013; Ratcliffe et al. 2022) sia nell'orata (Cuesta et al. 2006; Randelli et al. 2008) i geni che codificano le molecole di MHC di classe I e II sono stati individuati e le proteine da questi espresse sono state parzialmente caratterizzate.

Nella spigola sono stati identificati anche i recettori toll-like TLR1, TLR2 e TLR9 (Nunez Ortiz et al. 2014), mentre nell'orata sono stati riconosciuti TLR2, TLR5 e TLR22 (Munoz et al. 2014; Chen et al. 2020).

Riferimenti bibliografici

- Abelli, L., Gallo, V. P., Civinini, A., & Mastroli, L. (1996). Immunohistochemical and Ultrastructural Evidence of Adrenal Chromaffin Cell Subtypes in Sea Bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *General and comparative endocrinology*, 102(1), 113-122.
- Barroso, C., Carvalho, P., Carvalho, C., Santarém, N., Gonçalves, J. F., Rodrigues, P. N., & Neves, J. V. (2020). The diverse piscidin repertoire of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*): Molecular characterization and antimicrobial activities. *International journal of molecular sciences*, 21(13), 4613.
- Björger, H., & Koppang, E. O. (2022). Anatomy of teleost fish immune structures and organs. *Principles of Fish Immunology*, 1-30.
- Boehm, T. 2012. Evolution of vertebrate immunity. *Current Biology*, 22: R722–32.
- Boshra, H., Li, J., & Sunyer, J. O. (2006). Recent advances on the complement system of teleost fish. *Fish & shellfish immunology*, 20(2), 239-262.
- Breuil, G.B., B. Vassiloglou, J.F. Pepin, D.B. Romestand. (1997). Ontogeny of IgM-bearing cells and changes in the immunoglobulin M-like protein level (IgM) during larval stages in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Fish & Shellfish Immunology*, 7, 29–43.
- Buchmann, K. (2014). Evolution of innate immunity: clues from invertebrates via fish to mammals. *Frontiers in immunology*, 5, 459.
- Buoncore, F., Randelli, E., Casani, D., Costantini, S., Facchiano, A., Scapigliati, G., & Stet, R. J. (2007). Molecular cloning, differential expression and 3D structural analysis of the MHC class-II β chain from sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Fish & shellfish immunology*, 23(4), 853-866.
- Buoncore, F., Randelli, E., Trisolino, P., Facchiano, A., de Pascale, D., & Scapigliati, G. (2014). Molecular characterization, gene structure and antibacterial activity of a g-type lysozyme from the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Molecular Immunology*, 62(1), 10-18.
- Buoncore, F., Stocchi, V., Nunez-Ortiz, N., Randelli, E., Gerdol, M., Pallavicini, A., ... & Picchietti, S. (2017). Immunoglobulin T from sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): molecular characterization, tissue localization and expression after nodavirus infection. *BMC molecular biology*, 18(1), 1-14.

- Carbone, D., & Faggio, C. (2016). Importance of prebiotics in aquaculture as immunostimulants. Effects on immune system of *Sparus aurata* and *Dicentrarchus labrax*. *Fish & Shellfish Immunology*, 54, 172-178.
- Castellana, B., Marín-Juez, R., & Planas, J.V. (2013). Transcriptional regulation of the gilthead seabream (*Sparus aurata*) interleukin-6 gene promoter. *Fish & shellfish immunology*, 35(1), 71-78.
- Cervera, L., González-Fernández, C., Arizcun, M., Cuesta, A., & Chaves-Pozo, E. (2022). Severe Natural Outbreak of *Cryptocaryon irritans* in Gilthead Seabream Produces Leukocyte Mobilization and Innate Immunity at the Gill Tissue. *International journal of molecular sciences*, 23(2), 937.
- Chen, Z., D. Ceballos-Francisco, F.A. Guardiola, D. Huang, M.A. Esteban. The alleviation of skin wound-induced intestinal barrier dysfunction via modulation of TLR signalling using arginine in gilthead seabream (*Sparus aurata* L). *Fish & Shellfish Immunology*, 107: 519-528.
- Cordero, H., Mauro, M., Cuesta, A., Cammarata, M., & Esteban, M. Á. (2016). *In vitro* cytokine profile revealed differences from dorsal and ventral skin susceptibility to pathogen-probiotic interaction in gilthead seabream. *Fish & shellfish immunology*, 56, 188-191.
- Cuesta, A., Esteban, M. Á., & Meseguer, J. (2006). Cloning, distribution and up-regulation of the teleost fish MHC class II alpha suggests a role for granulocytes as antigen-presenting cells. *Molecular immunology*, 43(8), 1275-1285.
- Cuesta, A., Meseguer, J., & Esteban, M. A. (2008). The antimicrobial peptide hepcidin exerts an important role in the innate immunity against bacteria in the bony fish gilthead seabream. *Molecular immunology*, 45(8), 2333-2342.
- Dixon, B., & Stet, R. J. M. (2001). The relationship between major histocompatibility receptors and innate immunity in teleost fish. *Developmental & Comparative Immunology*, 25 (8-9), 683-699.
- dos Santos, N. M., Romano, N., de Sousa, M., Ellis, A. E., & Rombout, J. H. (2000). Ontogeny of B and T cells in sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.). *Fish & shellfish immunology*, 10(7), 583-596.
- Esteban, M. A., & Meseguer, J. (1997). Factors influencing phagocytic response of macrophages from the sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): an ultrastructural and quantitative study. *The Anatomical Record: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, 248(4), 533-541.
- Flajnik, M. F. (2018). A cold-blooded view of adaptive immunity. *Nature Reviews Immunology*, 18(7), 438-453.
- Galeotti, M., Romano, N., Volpatti, D., Bulfon, C., Brunetti, A., Tiscar, P. G., ... & Abelli, L. (2013). Innovative vaccination protocol against vibriosis in *Dicentrarchus labrax* (L.) juveniles: Improvement of immune parameters and protection to challenge. *Vaccine*, 31(8), 1224-1230.
- Gomez, D., Sunyer, J. O., & Salinas, I. (2013). The mucosal immune system of fish: the evolution of tolerating commensals while fighting pathogens. *Fish & shellfish immunology*, 35(6), 1729-1739.
- Hanif, A., Bakopoulos, V., Leonardos, I., & Dimitriadis, G. J. (2005). The effect of sea bream (*Sparus aurata*) broodstock and larval vaccination on the susceptibility by *Photobacterium damsela* subsp. piscicida and on the humoral immune parameters. *Fish & shellfish immunology*, 19(4), 345-361.
- <https://feap.info/wp-content/uploads/2022/03/production-report>
- <https://aquaticdiagnostics.com/>
- <https://ximbio.com/reagent/153529/anti-igt-z55f8c3>
- <https://bocascientific.com/>
- <https://aquaticdiagnostics.com/>
- Jósefsson, S., & Tatner, M. F. (1993). Histogenesis of the lymphoid organs in sea bream (*Sparus aurata* L.). *Fish & Shellfish Immunology*, 3(1), 35-49.
- Li, J., Jiang, X., Li, H., Gelinsky, M., & Gu, Z. (2021). Tailoring materials for modulation of macrophage fate. *Advanced Materials*, 33(12), 2004172.
- Mauri, I., Roher, N., MacKenzie, S., Romero, A., Machado, M., Balasch, J. C., ... & Tort, L. (2011). Molecular cloning and characterization of European seabass (*Dicentrarchus labrax*) and Gilthead seabream (*Sparus aurata*) complement component C3. *Fish & Shellfish Immunology*, 30(6), 1310-1322.
- Micoli, A., Buonocore, F., Picchiatti, S., & Scapigliati, G. (2021). The sea bass *Dicentrarchus labrax* as a marine model species in immunology: Insights from basic and applied research. *Aquaculture and Fisheries*, in stampa
- Muñoz, I., M.P. Sepulcre, J. Meseguer, V. Mulero. 2014. Toll-like receptor 22 of gilthead seabream, *Sparus aurata*: *Molecular cloning, expression profiles and post-transcriptional regulation* *Developmental and Comparative Immunology* 44(1), 173-179.
- Ortiz, N. N., Gerdol, M., Stocchi, V., Marozzi, C., Randelli, E., Bernini, C., ... & Scapigliati, G. (2014). T cell transcripts and T cell activities in the gills of the teleost fish sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Developmental & Comparative Immunology*, 47(2), 309-318.
- Panteli, N., Mastoraki, M., Lazarina, M., Chatzifotis, S., Mente, E., Kormas, K. A., & Antonopoulou, E. (2021). Configuration of gut microbiota structure and potential functionality in two teleosts under the influence of dietary insect meals. *Microorganisms*, 9(4), 699.

- Pauletto, M., Manousaki, T., Ferraresso, S., Babbucci, M., Tsakogiannis, A., Louro, B., ... & Bargelloni, L. (2018). Genomic analysis of *Sparus aurata* reveals the evolutionary dynamics of sex-biased genes in a sequential hermaphrodite fish. *Communications biology*, 1(1), 1-13.
- Piazzon, M. C., Galindo-Villegas, J., Pereiro, P., Estensoro, I., Calduch-Giner, J. A., Gómez-Casado, E., ... & Pérez-Sánchez, J. (2016). Differential modulation of IgT and IgM upon parasitic, bacterial, viral, and dietary challenges in a perciform fish. *Frontiers in immunology*, 7, 637.
- Picchietti, S., Buonocore, F., Guerra, L., Belardinelli, M. C., De Wolf, T., Couto, A., ... & Scapigliati, G. (2021). Molecular and cellular characterization of European sea bass CD3 ϵ + T lymphocytes and their modulation by microalgal feed supplementation. *Cell and Tissue Research*, 384(1), 149-165.
- Picchietti, S., Taddei, A. R., Scapigliati, G., Buonocore, F., Fausto, A. M., Romano, N., ... & Abelli, L. (2004). Immunoglobulin protein and gene transcripts in ovarian follicles throughout oogenesis in the teleost *Dicentrarchus labrax*. *Cell and tissue research*, 315(2), 259-270.
- Pinto, R. D., Randelli, E., Buonocore, F., Pereira, P. J., & dos Santos, N. M. (2013). Molecular cloning and characterization of sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) MHC class I heavy chain and β 2-microglobulin. *Developmental & Comparative Immunology*, 39(3), 234-254.
- Quesada, J., Villena, M. I., & Navarro, V. (1994). Ontogeny of the sea bass spleen (*Dicentrarchus labrax*): a light and electron microscopic study. *Journal of morphology*, 221(2), 161-176.
- Randelli, E., Scala, V., Casani, D., Costantini, S., Facchiano, A., Mazzini, M., ... & Buonocore, F. (2008). T cell receptor beta chain from sea bream (*Sparus aurata*): molecular cloning, expression and modelling of the complexes with MHC class I. *Molecular Immunology*, 45(7), 2017-2027.
- Ratcliffe, F. C., Garcia de Leaniz, C., & Consuegra, S. (2022). MHC class I- α population differentiation in a commercial fish, the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Animal Genetics*, 53 (3), 340-351.
- Reyes-López, F. E., Aerts, J., Vallejos-Vidal, E., Ampe, B., Dierckens, K., Tort, L., & Bossier, P. (2018). Modulation of innate immune-related genes and glucocorticoid synthesis in gnotobiotic full-sibling European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae challenged with *Vibrio anguillarum*. *Frontiers in immunology*, 9, 914.
- Román, L., Real, F., Padilla, D., El Aamri, F., Déniz, S., Grasso, V., & Acosta, F. (2013). Cytokine expression in head-kidney leucocytes of European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) after incubation with the probiotic *Vagococcus fluvialis* L-21. *Fish & shellfish immunology*, 35(4), 1329-1332.
- Rombout, J. H. W. M., Huttenhuis, H. B. T., Picchietti, S., & Scapigliati, G. (2005). Phylogeny and ontogeny of fish leucocytes. *Fish & shellfish immunology*, 19(5), 441-455.
- Salinas, I. (2015). The mucosal immune system of teleost fish. *Biology*, 4(3), 525-539.
- Saurabh, S., & Sahoo, P. K. (2008). Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system. *Aquaculture research*, 39(3), 223-239.
- Scapigliati, G., Buonocore, F., Bird, S., Zou, J., Pelegrin, P., Falasca, C., ... & Secombes, C. J. (2001). Phylogeny of cytokines: molecular cloning and expression analysis of sea bass *Dicentrarchus labrax* interleukin-1 β . *Fish & Shellfish Immunology*, 11(8), 711-726.
- Secombes, C. J. (1996). The nonspecific immune system: cellular defenses. *The fish immune system: organism, pathogen and environment*, 15, 63-103.
- Sunyer, J. O. (2013). Fishing for mammalian paradigms in the teleost immune system. *Nature immunology*, 14(4), 320-326.
- Sunyer, J. O., Tort, L., & Lambris, J. D. (1997). Structural C3 diversity in fish: characterization of five forms of C3 in the diploid fish *Sparus aurata*. *The Journal of Immunology*, 158(6), 2813-2821.
- Terova, G., Forchino, A., Rimoldi, S., Brambilla, F., Antonini, M., & Saroglia, M. (2009). Bio-Mos[®]: an effective inducer of dicentracin gene expression in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 153(4), 372-377.
- Tine, M., Kuhl, H., Gagnaire, P. A., Louro, B., Desmarais, E., Martins, R. S., ... & Reinhardt, R. (2014). European sea bass genome and its variation provide insights into adaptation to euryhalinity and speciation. *Nature communications*, 5(1), 1-10.
- Tort, L., Balasch, J. C., & Mackenzie, S. (2003). Fish immune system. A crossroads between innate and adaptive responses. *Inmunología*, 22(3), 277-286.
- Valero, Y., Arizcun, M., Cortes, J., Ramirez-Cepeda, F., Guzman, F., Mercado, L., ... & Cuesta, A. (2020). NK-lysin, dicentracin and hepcidin antimicrobial peptides in European sea bass. Ontogenetic development and modulation in juveniles by nodavirus. *Developmental & Comparative Immunology*, 103, 103516.
- Wegner, K. M. (2008). Historical and contemporary selection of teleost MHC genes: did we leave the past behind? *Journal of Fish Biology*, 73(9), 2110-2132.

3. Principali agenti infettivi patogeni del Mar Adriatico

Snježana Zrnčić

Istituto Veterinario Croato, Laboratorio di patologia ittica

Recenti pubblicazioni inerenti alla sorveglianza sanitaria nel bacino del Mediterraneo hanno dimostrato che le infezioni batteriche sono prevalentemente riscontrate (75,0%) nell'allevamento della spigola, mentre le infezioni parassitarie vengono segnalate più frequentemente nell'allevamento dell'orata (57,0%) (Muniesa et al. 2020). Secondo gli stessi documenti, la vibriosi causata da *Vibrio* sp. è la malattia batterica più frequentemente segnalata nella spigola durante le fasi di ingrasso, seguita da tenacibaculosi causata da *Tenacibaculum maritimum* e fotobatteriosi causata da *Photobacterium damseale* subsp. *piscicida*. Tuttavia, la vibriosi è stata segnalata in tutte le fasi della filiera, mentre la tenacibaculosi e la fotobatteriosi sembrano essere più problematiche durante le fasi di ingrasso. Inoltre, la spigola risulta maggiormente suscettibile alle sopracitate malattie batteriche rispetto all'orata (Rigos et al. 2021).

Attualmente non sono disponibili report specifici relativi alla prevalenza di malattie batteriche nel mare Adriatico, ma i due manoscritti citati includono dati ottenuti da allevamenti siti in questa area, che dimostrano come la situazione sia molto simile o addirittura identica a quella appena descritta.

Affinché i pesci allevati vengano mantenuti in buone condizioni di salute, tutte le figure coinvolte nella gestione sanitaria di spigole e orate dovrebbero disporre di informazioni di base riguardo alle principali malattie batteriche riscontrabili in allevamento; quindi viene di seguito presentata una revisione in merito alle malattie batteriche sopracitate.

Riferimenti bibliografici

Muniesa, A., B. Basurco, C. Aguilera, D. Furones, C. Reverte, A. Sanjuan Vilaplana, M. Dverdal Jansen, E. Brun, S. Tavornapahich. (2020). Mapping the knowledge of the main diseases affecting sea bass and sea bream in the Mediterranean. *Transboundary Emerging Diseases*, 67.

Rigos, G., D. Kogiannou, F. Padros, C. Crostofol, D. Florio, M.L. Fioravanti, D. Zarza. (2021). Best therapeutic practices for the use of antibacterial agents in finfish aquaculture: a particular view on European seabass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead seabream (*Sparus aurata*) in Mediterranean aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, 13, 1285-1323.

3.1. Vibriosi causata da *Vibrio anguillarum*

Dražen Oraić

Istituto Veterinario Croato, Laboratorio di patologia ittica

3.1.1. Agente eziologico

La vibriosi causata da *Vibrio anguillarum* colpisce diverse specie di pesci e molluschi di acqua marina e salmastra ed è stata descritta per la prima volta nel 1718 in Italia come “peste rossa”, a seguito del rilevamento di significative mortalità in anguille (Austin and Austin 2007). Attualmente, la malattia è diffusa in tutto il mondo e sono state riportate numerose segnalazioni in più di 50 specie ittiche marine e d’acqua dolce (Toranzo et al. 2004).

L’agente patogeno responsabile di questa malattia chiamata “*pestis rubra anguillarum*” o “*erysipelosis anguillarum*” è stato inizialmente denominato *Bacillus anguillarum*. Più tardi, la stessa malattia è stata osservata in anguille del Mar Baltico e l’agente patogeno isolato è stato chiamato *Vibrio anguillarum*. Grazie allo sviluppo di strumenti molecolari specifici e sulla base di dati di sequenziamento, MacDonell e Colwell (1985) hanno riclassificato il patogeno come *Listonella anguillarum* ed esso è stato ufficialmente escluso dalla famiglia delle Vibrionaceae. Specificatamente, solo tre specie batteriche sono state incluse nel genere *Listonella* – *L. anguillarum*, *Listonella damsela* e *Listonella pelagius* – fino a quando non sono state riclassificate nel genere *Vibrio* (Dikow 2011; Thompson et al. 2011). Oggi, la classificazione accettata di *V. anguillarum* sembra essere *Vibrio (Listonella) anguillarum* (Hickey and Lee 2018).

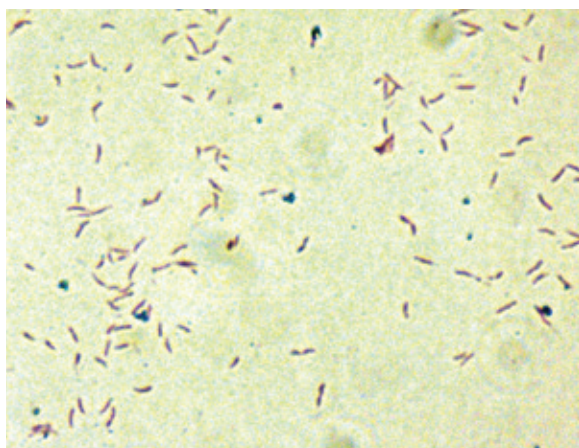


Figura 2. *Vibrio anguillarum* a forma di virgola fissati su vetrino e colorati con Giemsa

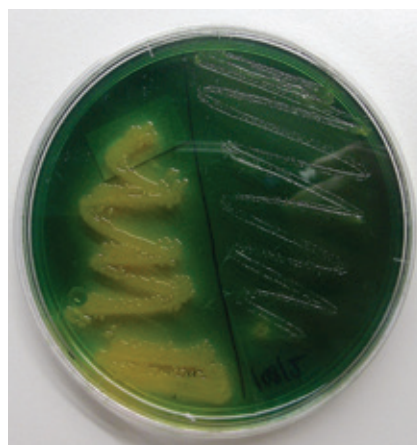


Figura 3. Tipiche colonie gialle di *V. anguillarum* su TCBS agar

V. anguillarum è un batterio a bastoncino Gram-negativo, a forma di virgola, di larghezza compresa tra 0,3 e 0,5 µm e lungo da 1,0 a 3,5 µm (Fig. 2), alofilo, non sporigeno, anaerobico facoltativo con flagelli polari inguainati monotrichi singoli (Actis et al. 1999). Cresce su terreni solidi contenenti dall'1,5 al 2% di NaCl a 15-30°C e produce colonie cremose gialle a forma rotonda su terreno vibrio-selettivo tiosolfato citrato bile saccarosio agar (TCBS) (Fig. 3), inducendo la fermentazione del saccarosio. Finora, sono stati identificati 23 diversi sierotipi di *V. anguillarum* (O1-O23), ma solo i sierotipi O1, O2 e, in misura minore, O3 hanno mostrato patogenicità per le specie ittiche, mentre gli altri sierotipi comunemente isolati da campioni ambientali sono risultati non patogeni (Pedersen et al. 1999).

3.1.2. Infezione e fattori ambientali

La via di infezione di *V. anguillarum* è, ancora oggi, oggetto di dibattito. I batteri vengono ingeriti dai pesci attraverso cibo o acqua contaminati, sopravvivono al basso pH gastrico, entrano nell'intestino dove aderiscono all'epitelio intestinale e proliferano; infine, penetrano nel circolo sanguigno causando setticemia (Grisez et al. 1996). Un'altra via di ingresso è rappresentata dalla cute lesa o uno strato di muco danneggiato. La diffusione dei batteri è orizzontale da pesce infetto a pesce sano, ma anche attraverso mangimi, acqua o attrezzature contaminate. *V. anguillarum* è un abitante naturale dell'ambiente marino, pertanto potrebbe sopravvivere nei sedimenti fino a 50 mesi.

La malattia si manifesta comunemente quando le temperature sono elevate. Fattori predisponenti all'insorgenza di focolai di malattia sono anche una scarsa saturazione di ossigeno in acqua, scarso ricambio idrico, stress dovuto ad aumento o diminuzione della temperatura dell'acqua, alta densità di popolazione, manipolazione, ecc. (Le Breton 1996; Frans et al. 2011). La presenza di metalli pesanti, in particolare rame e ferro, contribuisce all'esacerbazione della malattia; in particolare, l'elevata concentrazione e l'esposizione prolungata al rame aumentano la suscettibilità dei pesci alla vibriosi (Austin and Austin 1993). Nel mare Adriatico lo sviluppo della vibriosi dipende dalla stagione, in quanto è stato ampiamente documentato che le forme acute e subacute si manifestano prevalentemente durante la primavera e l'autunno mentre le forme croniche si verificano soprattutto durante l'inverno.

3.1.3. Aspetti clinici della malattia

La **forma acuta** colpisce generalmente i giovani pesci, spesso senza alcun sintomo e con una mortalità che può raggiungere l'80% (Frerichs and Roberts 1989). La **forma acuta e subacuta** della malattia è solitamente caratterizzata da letargia, anoressia e scurimento della cute come primi sintomi (Fig. 4), seguiti da eritema intorno alla bocca, alla base delle pinne, lesioni edematose della cute, ulcerazioni, lesioni ed emorragie sulla testa, opercolo, branchie anemiche ed emorragiche (Fig. 5). All'esame necroscopico, sono presenti emorragie a livello epatico nella parte posteriore dell'intestino e, più raramente, allo stomaco (Fig. 6). La **forma cronica** è caratterizzata da estese erosioni

cutanee di forma circolare, circondate da emorragie, che spesso progrediscono in ulcerazione (Fig. 7), grave anemia delle branchie e opacità corneale (Haenen et al. 2014).



Figura 4. Aumento della pigmentazione della cute e nuoto separato dagli altri pesci presenti in vasca sono i primi sintomi della vibriosi causata da *V. anguillarum*



Figura 5. Emorragie estese all'area buccale, intorno agli opercoli, alla base delle pinne e in tutta la regione ventrale fino alla zona anale, in spigola affetta da vibriosi subacuta causata da *V. anguillarum*



Figura 6. Emorragie comunemente visibili a livello del fegato, dello stomaco e dell'intestino in spigola affetta da forma acuta di vibriosi causata da *V. anguillarum*



Figura 7. Spigola affetta da forma cronica di vibriosi: sono visibili un'area di erosione cutanea, circondata da lievi emorragie in basso a sinistra e un'area di ulcerazione cutanea più in alto a destra

3.1.4. Gestione della malattia

Sono stati sviluppati diversi vaccini commerciali per proteggere i pesci dalla vibriosi, costituiti principalmente da entrambi i sierotipi di *V. anguillarum* O1 e O2 inattivati (Haenen et al. 2014). La loro efficacia dipende dalla via di somministrazione: i) la somministrazione intraperitoneale è la più efficace ma richiede tempo, il coinvolgimento di molti operatori e induce la formazione di granulomi, infiammazioni e pigmentazioni; ii) la procedura di immersione è spesso preferita, nonostante la durata dell'immunità indotta sia più breve; iii) la vaccinazione orale è la meno efficace a causa della degradazione del vaccino durante il suo passaggio attraverso il tratto intestinale.

Metodi efficaci per prevenire la diffusione della vibriosi negli allevamenti ittici dovrebbero includere l'applicazione delle buone pratiche (*good aquaculture practice*

– GAP), l’attuazione di misure igieniche e di biosicurezza, evitare lo stress durante la manipolazione dei pesci e l’immunostimolazione. A questo proposito, alcune misure profilattiche alternative come l’inclusione nella dieta di isolati batterici probiotici, alghe, prebiotici, estratti di lievito (Rodrigues-Estrada et al. 2008) o altri immunostimolanti come i prodotti naturali marini (MNPs) stanno dando risultati promettenti in quanto stimolano la risposta immunitaria dei pesci nei confronti di *V. anguillarum* e conseguentemente la loro resistenza alle infezioni (risultati di ricerca UNIUD nell’ambito del progetto AdriAquaNet).

In alcuni casi, l’applicazione di sostanze antimicrobiche è inevitabile e il trattamento con flumechina, sulfonamidi potenziati e ossitettraciclina inclusi nel mangime risulta efficace nel ridurre le perdite di pesce negli impianti di maricoltura. Tuttavia, risulta fondamentale effettuare una diagnosi tempestiva e, possibilmente, un antibiogramma sul ceppo batterico isolato al fine di testare la suscettibilità agli antibiotici prima di iniziare la terapia (Haenen et al. 2014).

Riferimenti bibliografici

- Actis, L. A., Tolmasky, M. E., & Crosa, J. H. (2011). *Vibriosis in Fish diseases and disorders. Volume 3: viral, bacterial and fungal infections*, (Ed. 2). CABI International, Wallingford, UK. pp. 570-605.
- Austin, B., & Austin, D. A. (1993). *Bacterial fish pathogens: diseases in farmed and wild fish*, (Ed. 2). Ellis Horwood, London. pp. 265-307.
- Austin, B., & Austin, D. A. (2007). *Bacterial fish pathogens: diseases in farmed and wild fish*, (Ed. 4). Springer-Praxis Publishing, Ltd., United Kingdom
- Dikow, R.B. (2011). Systematic relationships within Vibrionaceae (Bacteria: Gammaproteobacteria): steps toward a phylogenetic taxonomy. *Cladistics*, 27, 9– 28.
- Frans, I., Michiels, C. W., Bossier, P., Willems, K. A., Lievens, B., & Rediers, H. (2011). *Vibrio anguillarum* as a fish pathogen: virulence factors, diagnosis and prevention. *Journal of fish diseases*, 34(9), 643-661.
- Frerichs, G. N., & Roberts, R. J. (1989). The bacteriology of teleosts. *Fish pathology*, 289-319.
- Grisez, L., Sorgeloos, P., & Ollevier, F. (1996). Mode of infection and spread of *Vibrio anguillarum* in turbot *Scophthalmus maximus* larvae after oral challenge through live feed. *Diseases of aquatic organisms*, 26(3), 181-187.
- Haenen, O. L. M., Fouz Rodríguez, B., Amaro González, C., Isern, M. M., Mikkelsen, H., Zrnčić, S., & Dalsgaard, I. (2014). Vibriosis in aquaculture. 16th EAAP Conference, Tampere, Finland, 4th September 2013. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 2014, vol. 34, num. 4, p. 138-147.
- Hickey, M. E., & Lee, J. L. (2018). A comprehensive review of *Vibrio (Listonella) anguillarum*: ecology, pathology and prevention. *Reviews in Aquaculture*, 10(3), 585-610.
- Le Breton, A. (1996). An overview of the main infectious problems in cultured seabass *Dicentrarchus labrax* and seabream *Sparus aurata*: solutions. In *International workshop on “sea bass and sea bream culture: problems and prospects”*. European Aquaculture Society (pp. 67-86).
- MacDonell, M. T., & Colwell, R. R. (1985). Phylogeny of the Vibrionaceae, and recommendation for two new genera, Listonella and Shewanella. *Systematic and applied microbiology*, 6(2), 171-182.
- Pedersen, K., Grisez, L., Houdt, R. V., Tiainen, T., Ollevier, F., & Larsen, J. L. (1999). Extended serotyping scheme for *Vibrio anguillarum* with the definition and characterization of seven provisional O-serogroups. *Current microbiology*, 38(3), 183-189.
- Rodrigues-Estrada, U., Satoh, S., Haga, Y., Fushimi, H., & Sweetman, J. (2008). Studies of the effects of mannan-oligosaccharides, *Enterococcus faecalis*, and poly hydrobutyric acid as immune stimulant and growth promoting ingredients in rainbow trout diets. In *5th World Fisheries Congress, Yokohama, Japan, October* (pp. 20-25).
- Thompson, F.L., C.C. Thompson, G.M. Dias, H. Naka, C. Dubay, J.H. Crosa. (2011). The genus *Listonella* MacDonell and Colwell 1986 is a later heterotypic synonym of the genus *Vibrio* Pacini 1854 (approved lists 1980) – a taxonomic opinion. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61, 3023-3027.
- Toranzo, A. E. (2004). Report about fish bacterial diseases. *Mediterranean Aquaculture Laboratories, ed. Alvarez-Pellitero P, Barja JL, Basurco B, Berthe F, Toranzo AE*, 49-89.

3.2. Vibriosi causata da *Vibrio harveyi*

Ivana Giovanna Zupčić

Istituto Veterinario Croato, Laboratorio di patologia ittica

3.2.1. Agente eziologico

Il clade del batterio *Vibrio harveyi* raggruppa undici batteri patogeni strettamente correlati tra loro e molto importanti per gli animali acquatici: *V. harveyi*, *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. campbellii*, *V. rotiferianus*, *V. mytili*, *V. natriegens*, *V. azureus*, *V. sagamiensis*, *V. owensii* e *V. jasicida* che presentano un'elevata omologia sia genotipica che fenotipica (Urbanczyk et al. 2013). Tutte le specie batteriche citate vengono comunemente riscontrate nelle acque e nei sedimenti marini e degli estuari (Hernandez et al. 2004).

V. harveyi è stato descritto inizialmente come una delle cause di mortalità massiva negli incubatoi di gamberi e, successivamente è stato anche isolato durante alcuni focolai di malattia in diverse specie di pesci allevati nella regione subtropicale, come ad esempio cernia, barramundi, pesci piatti e pompano. Inoltre, viene considerato il patogeno più impattante nell'acquacoltura marina cinese (Karunasagar et al. 1994; Lavilla-Pitogo et al. 1998; Qin et al. 2006; Tendencia 2002; Pakingking et al. 2018). Negli ultimi dieci anni, *V. harveyi* sta causando sempre più spesso ingenti perdite nell'acquacoltura mediterranea e adriatica durante i mesi estivi (Zupicic et al. 2019).

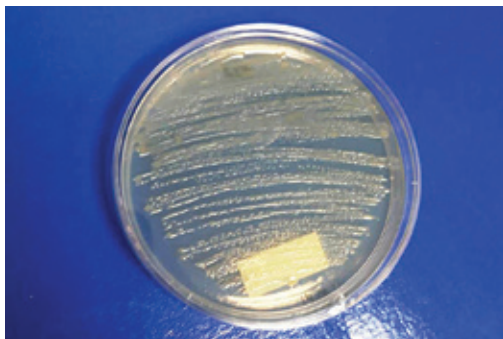


Figure 8. Tipiche colonie di *Vibrio harveyi*

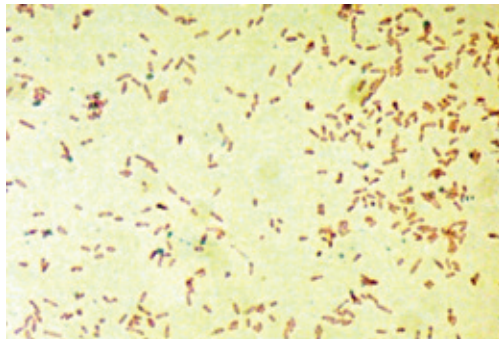


Figure 9. *V. harveyi* su vetrino colorato con colorazione di Gram

Si tratta di un batterio Gram-negativo (Fig. 8-9), alofilo, aerobio o anaerobio facoltativo con esigenze di coltura simili a quelle di *V. anguillarum*. È una specie opportunistica e ceppi non patogeni vengono spesso trovati nella normale flora dell'ospite o nell'ambiente, sebbene siano stati isolati anche ceppi altamente patogeni (Pretto 2018). Nel bacino del Mediterraneo sono stati identificati diversi sierotipi ma tre sono predomi-

nanti; tra questi, un nuovo sierotipo “emergente” molto patogeno è stato isolato in Spagna e nel mare Adriatico. Tuttavia, alcuni degli isolati di *V. harveyi* non appartengono a nessuno di questi tre sierotipi (Amaro et al. 2020).

3.2.2. Infezione e fattori ambientali

I principali fattori di virulenza di *V. harveyi* sono il flagello, che ne consente la mobilità, gli enzimi litici, la formazione della capsula, i siderofori che intervengono nel sequestro del ferro, la presenza di antigeni di superficie idrofobi e l'abilità di aderire e infettare le cellule epiteliali dell'ospite (Wang and Leung 2000; Ruwandepika et al. 2012). La produzione di biofilm da parte di questa specie batterica rappresenta un meccanismo di antibiotico-resistenza e la sua capacità di estrarre ferro dalle cellule dell'ospite è cruciale per la sua sopravvivenza. Inoltre, la comunicazione intracellulare tra i batteri all'interno delle cellule dell'ospite consente loro di agire in gruppo e questo meccanismo risulta fondamentale per la loro virulenza (Themptander 2005).

La patogenesi è basata sulla chemiotassi, che consente al patogeno di penetrare nei tessuti dell'ospite, attivare il meccanismo di sequestro del ferro e produrre tossine extracellulari, inducendo i sintomi clinici nei pesci. L'infezione implica diffusione tramite il circolo sanguigno e colonizzazione dei diversi organi, provocando setticemia e morte dei pesci (Thompson et al. 2004). La malattia ha una trasmissione orizzontale, da pesce malato a pesce sano.

È stato provato che la salinità e la temperatura dell'acqua marina sono di cruciale importanza per la patogenicità di *V. harveyi*. Nella regione adriatica, la vibriosi causata da *V. harveyi* si verifica solitamente durante i mesi estivi, quando le temperature sono più alte.

3.2.3. Aspetti clinici della malattia

I primi sintomi di malattia sono rappresentati da letargia e perdita di appetito, seguiti da depigmentazione, erosione della cute, emorragie alla base delle pinne, necrosi ed ulcerazioni, branchie pallide e sanguinamenti dell'epitelio branchiale (Fig. 10, 12). Negli stadi più avanzati, è possibile notare sintomi nervosi causati da congestione encefalica, nuoto scoordinato, cheratiti, opacità della cornea ed esoftalmo. A causa di evidenze cliniche simili a quelle provocate dal virus della necrosi nervosa (VNN), è necessario procedere con una diagnosi differenziale che escluda la presenza di questo patogeno.

All'esame necroscopico, sono evidenti emorragie e presenza di essudato o ascite; inoltre, sono visibili congestione focale del fegato ed emorragie petecchiali, enteriti sierose o catarrali, necrosi intestinale e lume intestinale pieno di essudato da bianco a giallo (Fig. 11) (Zhang and Austin 2000).



Figura 10. Erosioni a livello della cute della testa ed emorragie su corpo e base delle pinne in spigole affette da vibriosi causata da *V. harveyi*



Figura 11. Congestione del fegato ed enterite sierosa-catarrale in spigole affette da vibriosi causata da *V. harveyi*



Figura 12. Segni clinici provocati da infezione i/p con *V. harveyi* in spigola

3.2.4. Gestione della malattia

Non sono attualmente disponibili vaccini efficaci per prevenire questa malattia; tuttavia, alcuni articoli scientifici hanno riportato promettenti risultati di prove sperimentali effettuate con diverse tipologie di vaccini.

Per questo motivo, le uniche strategie attuabili per prevenire la diffusione della vibriosi causata da *V. harveyi* in allevamento sono l'applicazione delle GAP e il trattamento dei pesci con antimicrobici. A questo proposito, la maggior parte degli isolati croati si sono dimostrati suscettibili a ossitetraclina, flumechina, florfenicolo e cotrimossazolo.

Risultati incoraggianti sono stati ottenuti anche in esperimenti di terapia fagica, che hanno dimostrato l'efficacia di batteriofagi litici su *Artemia* infettata con *V. harveyi* (Misol et al. 2020).

Riferimenti bibliografici

Amaro, C., B. Fouz, E. Sanjuan J.L. Romalde. (2020). Vibriosis. in *Climate Change and Infectious Fish Diseases*. (Woo, P. T. K., J. A. Leong, K. Buchmann, Eds), CAB International, Wallingford, pp. 182-210.

Hernández, C.R, C.H.L. Martínez, A.A. Díaz, O.A. Romero, R.C. Godínez, G.A. Zavala, R.A. Verdugo. (2004). Aerobic bacterial flora of the nasal cavity in Gulf of California sea lion (*Zalophus californianus*). *The Veterinary Journal*, 170, 359-363.

- Karunasagar, I., R. Pai, G.R. Malathi, I. Karunasagar. (1994). Mass mortality of *Penaeus monodon* larvae due to antibiotic-resistant *Vibrio harveyi* infection. *Aquaculture*, 128, 203-209.
- Lavilla-Pitogo, C.R., E.M. Leño, M.G. Paner. 1998. Mortalities of pond-cultured juvenile shrimp, *Penaeus monodon*, associated with dominance of luminescent vibrios in the rearing environment. *Aquaculture*, 164, 337–349.
- Misol, G.N.Jr., C. Kokkari, P. Katharios. (2020). Biological and genomic characterization of a novel jumbo bacteriophage, vB_VhaM_pir03 with broad host lytic activity against *Vibrio harveyi*. *Pathogens*, 9, 12: 1051.
- Pakingking, R., N.B. Bautista, D. Catedral, E.G. De Jesus-Ayson. (2018). Characterisation of *Vibrio* isolates recovered from the eyes of cage-cultured pompano (*Trachinotus blochii*) infested with caligid parasites (*Lepeophtheirus spinifer*). *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 38, 35-41
- Pretto, T. (2018). Vibriosis caused by *Vibrio harveyi*: studies on pathogenesis and vaccine efficacy in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). PhD Thesis. University of Bologna, Italy.
- Ruwandeeepika, H.A.D., T.S.P. Jayaweera, P.P. Bhowmick, I. Karunasagar, P. Bossier, T. Defoirdt. (2012). Pathogenesis, virulence factors and virulence regulation of vibrios belonging to the *Harveyi* clade. *Reviews in Aquaculture*, 4, 59-74.
- Qin, Y.X., J. Wang, Y.Q. Su, D.X. Wang, X.Z. Chen. (2006). Studies on the pathogenic bacterium of ulcer disease in *Epinephelus awoara*. *Acta Oceanologica Sinica*, 25, 154-159.
- Tendencia, E.A. (2002). *Vibrio harveyi* isolated from cage-cultured seabass *Lates calcarifer* Bloch in the Philippines. *Aquaculture Research*, 33, 455-458.
- Themptander, K. (2005). Detection and characterisation of *Vibrio harveyi* isolates. PhD Thesis. Medical Faculty University of Upsala.
- Thompson, F.L., T. Iida, J. Swings. (2004). Biodiversity of vibrios. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68, 403-431.
- Urbanczyk, H., Y. Ogura, I.T. Hayash. (2013). Taxonomic revision of *Harveyi* clade bacteria (family *Vibrionaceae*) based on analysis of whole genome sequences. *International Journal of Systemic and Evolutionary Microbiology*, 63, 2742-2751.
- Wang, X.H., K.Y. Leung. (2000). Biochemical characterization of different types of adherence of *Vibrio* species to fish epithelial cells. *Microbiology*, 146, 989-998.
- Zhang, X. H. and B. Austin. (2000). Pathogenicity of *Vibrio harveyi* to salmonids. *Journal of Fish Diseases*, 23, 93-102.
- Zupičić, I.G., Ž. Pavlinec, D. Oraić, S. Zrnčić. (2019). Emerging vibriosis of Mediterranean fish caused by *Vibrio harveyi* bacteria: an overview. *Veterinarska stanica*, 50, 455-463.

3.3. Fotobatteriosi causata da *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*

Marco Galeotti, Chiara Bulfon e Valentina Pacorig

*Università di Udine, Dipartimento di Scienze AgroAlimentari,
Ambientali e Animali*

3.3.1. Agente eziologico

La fotobatteriosi causata da *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, precedentemente chiamata pasteurellosi ittica o pseudotubercolosi, è una malattia setticemica che è stata segnalata per la prima volta nel 1953 negli USA e poi si è diffusa rapidamente in Giappone e in Europa, dove è stata riscontrata a partire dagli anni Novanta in diversi Paesi del bacino del Mediterraneo. Attualmente, viene ancora considerata tra le più importanti malattie batteriche della maricoltura, avendo una distribuzione mondiale e colpendo un elevato numero di specie ittiche sia allevate che selvatiche di acqua salata e salmastra (sopravvive in acqua dolce per circa 48 h e in acqua salmastra per 3-5 giorni), con significativi tassi di mortalità e conseguenti perdite economiche negli impianti di acquacoltura marina. Le specie ittiche più colpite sono la seriola (*Seriola quinqueradiata*) in Giappone, il pagro comune (*Pagrus pagrus*), il pagro maggiore (*Pagrus major*), la spigola (*Dicentrarchus labrax*), l'ombrina boccadoro (*Argyrosomus regius*), la sogliola (*Solea* spp.), il persico spigola (*Morone saxatilis*), la perca (*Morone americana*) e un ibrido di persico spigola e spigola americana (*Morone saxatilis* x *Morone chrysops*) negli USA, l'orata e la spigola in molti Paesi europei tra i quali Francia, Italia, Croazia, Malta, Spagna, Portogallo, Grecia, in Israele e Turchia (Andreoni and Magnani 2014).

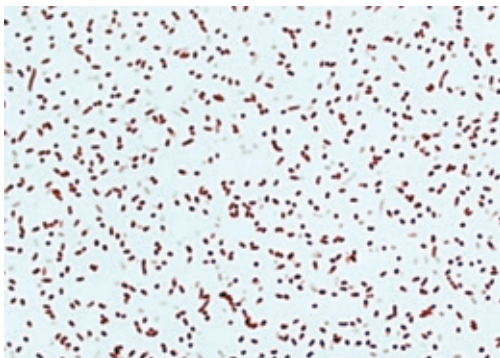


Figura 13. *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* fissato su vetrino e colorato con colorazione di Gram

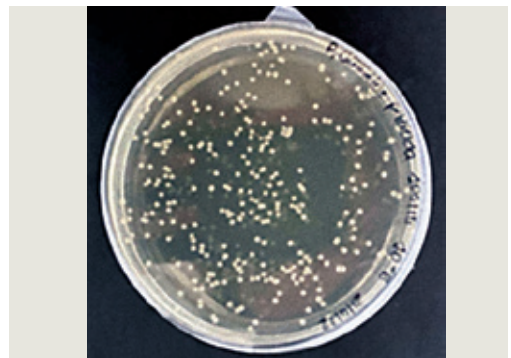


Figura 14. Tipiche colonie bianche traslucide di *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* isolate da spigola. Le colonie crescono su terreno trypticase soy agar (TSA) o agar sangue

P. damsela subsp. *piscicida* (Phdp) è un batterio Gram negativo, alofilo, asporigeno, anaerobico facoltativo, membro della famiglia Vibrionaceae (Fig. 13, 14). È stato isolato per la prima volta nella perca (*Morone americanus*) e nel persico spigola (*Morone saxatilis*) da Sniezsko (1964), successivamente è stato classificato da Janssen and Surgalla (1968) e definitivamente identificato da Gauthier et al. (1995).

3.3.2. Infezione, patogenesi e fattori ambientali

Le infezioni sostenute da *P. damsela* subsp. *piscicida* si sviluppano mediante trasmissione orizzontale dei batteri da pesce infetto a pesce sano oppure attraverso acqua, alimento o attrezzature contaminati (Andreoni and Magnani 2014). La penetrazione dei batteri nell'ospite avviene attraverso la cute, le branchie e l'intestino. I batteri aderiscono alle cellule epiteliali cutanee, branchiali o intestinali grazie alla loro robusta capsula lipopolisaccaridica, che ne facilita l'adesione come osservato nell'intestino dell'orata (Galeotti et al. 1995, 1996; Magariños et al. 1996a, 1996b; Romalde 2002).

Il periodo di incubazione della malattia può durare da 48 ore a 4 giorni, a seguito del quale si sviluppa una forte setticemia che porta i batteri a diffondersi in tutti i distretti ematici e a raggiungere diversi organi, tra cui fegato, milza, rene e cuore. Nella milza, i batteri vengono rapidamente fagocitati da macrofagi e neutrofili ma rimangono vitali al loro interno per almeno 7 giorni grazie alla capsula lipopolisaccaridica, che non consente alle cellule di attuare il *killing*. Spesso i macrofagi veicolano al loro interno i batteri nel sangue e in altri organi, proteggendoli dalle difese immunitarie specifiche e non-specifiche dell'ospite e da agenti antimicrobici esogeni, inclusi gli antibiotici, mediante un meccanismo *Trojan horse-like* (Galeotti et al. 1995, 1996; Romalde 2002; Barnes and Ellis 2004; Jung et al. 2008; Acosta et al. 2009). Inoltre, nei pesci malati sono stati osservati emboli batterici, resistenti all'azione microbicida delle componenti immunitarie contenute nel siero, che vengono veicolati dal sangue insieme ai macrofagi carichi di batteri e raggiungono la circolazione branchiale, dove possono bloccarsi alla base dei capillari delle lamelle primarie e provocare lesioni ischemiche gravi e fatti necrotici. Quest'ultimo meccanismo di patogenesi viene considerato la causa principale di morte per asfissia nei pesci infettati da Phdp (Galeotti et al. 1995, 1996).

Altre azioni patologiche di Phdp sono la capacità di sequestrare ferro all'ospite mediante siderofori ad alta affinità o acquisendolo da emina ed emoglobina (Magariños et al. 1994a; Jung et al. 2007) e la secrezione di prodotti extracellulari (ECPs) con attività emolitica, proteolitica, citotossica e fosfolipasica, che sono responsabili del danno alle cellule infette e del conseguente rilascio dei batteri e colonizzazione delle cellule adiacenti (Bakopoulos et al. 2002, 2004). In particolare, sembra importante la secrezione di una esotossina codificata da plasmide (AIP56) che attiva l'apoptosi di macrofagi e neutrofili (Do Vale et al. 2005). Recentemente, è stato dimostrato che Phdp induce una sovraregolazione di geni con funzioni soppressive, determinando una depressione dell'immunità dell'ospite (Pellizzari et al. 2013).

La malattia, tendenzialmente, compare quando la temperatura dell'acqua è elevata (sopra i 23 C°), la salinità si trova tra 20 ‰ e 30 ‰, la concentrazione di ossigeno è bassa e la qualità dell'acqua è scarsa. Fattori predisponenti che maggiormente possono favorire la diffusione della malattia sono la densità eccessiva dei pesci nelle vasche/gabbie di allevamento, la comparsa di stress ambientale (aumento o diminuzione improvvisi della temperatura dell'acqua, manipolazione eccessiva), o alterati parametri fisico-chimici dell'acqua (temperatura, salinità e saturazione di ossigeno alterate, eutrofizzazione, presenza di sostanze inquinanti) (Miccoli et al. 2019).

É stata anche dimostrata una diversa suscettibilità dei pesci alla malattia, in funzione dell'età. Infatti, larve e giovanili sono più suscettibili alle infezioni causate da Phdp rispetto ai soggetti adulti di taglia superiore ai 50 gr e mostrano mortalità fino al 90–100% durante le infezioni acute. Ciò è dovuto alla maggiore funzionalità di macrofagi e neutrofili nei pesci adulti, che quindi possono più efficacemente fagocitare e uccidere i batteri (Romalde 2002; Andreoni and Magnani 2014).

3.3.3. Aspetti clinici ed anatomopatologici della malattia

La malattia si presenta comunemente in **forma iperacuta e acuta** negli stadi larvali e nei giovanili. I pesci si presentano iper-pigmentati, letargici, con squilibri natatori e nuoto in superficie, diminuzione dell'alimentazione e aumento della frequenza respiratoria. Con l'avanzare della malattia si osservano anoressia, letargia, aumento della pigmentazione della cute e talvolta erosioni cutanee. Le branchie diventano pallide, con presenza di ipersecrezione e aree necrotiche. Compaiono aree con lieve congestione vasale e fatti erosivi a livello cutaneo, soprattutto a carico dell'attaccatura delle pinne, sul muso o in vicinanza dell'ano. I pesci morti vengono trovati sul fondo delle vasche, con scarse



Figura 15. Giovanile di spigola affetto da fotobatteriosi acuta causata da Phdp: in cavità addominale sono visibili lievi emorragie diffuse, splenomegalia, piccole lesioni biancastre puntiformi

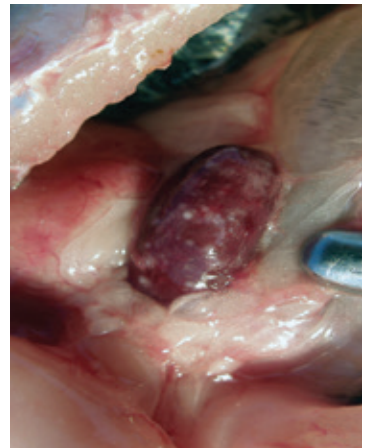


Figura 16. Splenomegalia a maggior ingrandimento in giovanile di spigola affetto da fotobatteriosi acuta causata da Phdp: visibili piccole lesioni biancastre puntiformi causate da focolai necrotici

lesioni. All'apertura della cavità addominale, sono evidenti lievi emorragie diffuse e la milza appare splenomegalica, disseminata di piccole aree biancastre, tendenzialmente circolari, non rilevate, che costituiscono focolai necrotici (Fig. 15, 16). Il rene appare chiaro (Fig. 15). A livello istologico, la milza si presenta cosparsa di numerose colonie batteriche circondate da macrofagi ripieni di batteri (Fig. 17, 18), che appaiono fortemente positivi all'immunoistochimica (IHC) con anticorpo specifico (Fig. 19, 20). Attorno alle colonie batteriche e ai macrofagi, risulta solitamente evidente la presenza di abbondante tessuto necrotico acidofilo (Fig. 18) (Galeotti et al. 1995, 1996; Essam et al. 2016).

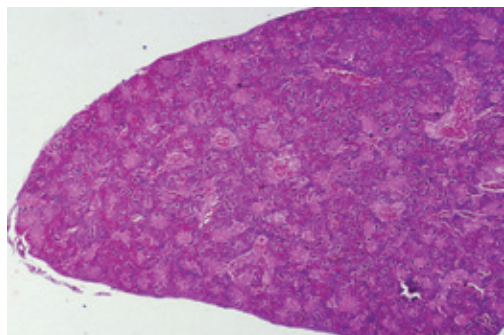


Figura 17. Quadro istologico della milza in giovanile di spigola affetto da fotobatteriosi acuta causata da Phdp: presenza di focolai necrotici con evidente stato di reattività e presenza di numerose colonie batteriche. E&E

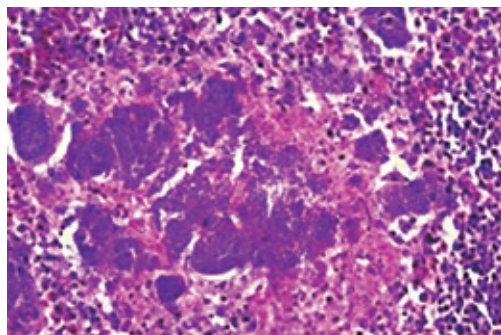


Figura 18. Particolare della Fig. 17: sono visibili colonie batteriche e macrofagi, circondati da abbondante tessuto necrotico acidofilo. E&E

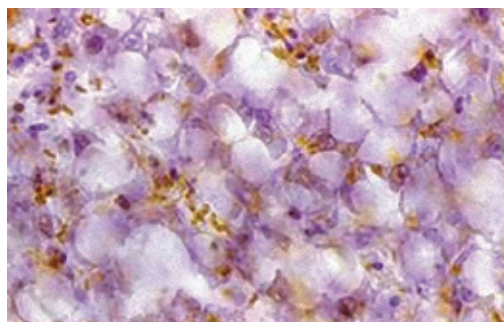


Figura 19. *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* marcati con anticorpo specifico nel fegato di spigola. IHC

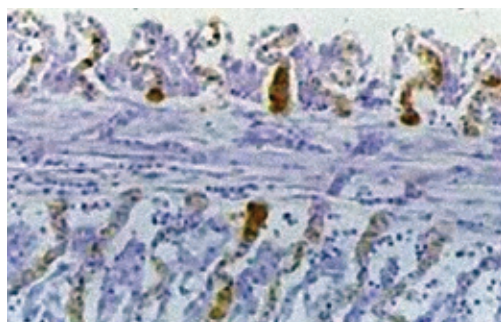


Figura 20. Presenza di emboli batterici e macrofagi carichi di batteri marcati con anticorpo specifico all'interno dei capillari delle lamelle primarie delle branchie. IHC

La **forma cronica** della malattia si osserva tendenzialmente in soggetti adulti, come esito di precedenti infezioni acute superate. Le uniche lesioni vengono osservate a livello della milza, che si presenta aumentata di volume e cosparsa da formazioni nodulari biancastre puntiformi di grandezza variabile da un grano di miglio ad alcuni millimetri,

talvolta confluenti, spesso debordanti sulla superficie (Fig. 21), che comportano alterazione dell'architettura dell'organo (Fig. 22). A livello istologico, è possibile osservare che queste lesioni evolvono da semplici focolai necrotici a veri granulomi, caratterizzati da un centro necrotico dove non si rinvergono batteri (negatività all'IHC con anticorpo specifico), circondato da macrofagi, cellule epiteliodi e reazione fibroconnettivale. Tali granulomi ricordano nell'aspetto i tipici noduli che si osservano nella milza di pesci con micobatteriosi ittica e questo è il motivo per cui la fotobatteriosi è stata chiamata per anni pseudotubercolosi (Galeotti et al. 1995, 1996).



Figura 21. Milza in adulto di spigola affetto da fotobatteriosi cronica: la milza si presenta aumentata di volume e cosparsa di formazioni nodulari, biancastre della grandezza da un grano di miglio ad alcuni millimetri, talvolta confluenti, spesso debordanti sulla superficie

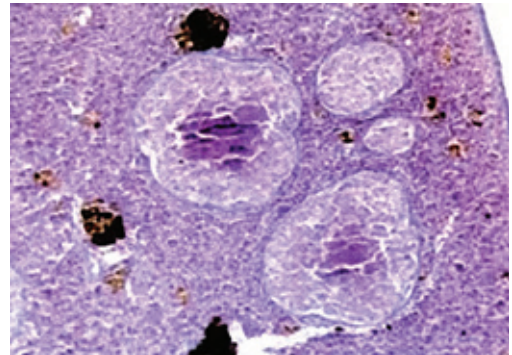


Figura 22. Preparato istologico riferito alla Fig. 21: si osservano granulomi formati da un centro necrotico circondato da macrofagi, cellule epiteliodi e reazione fibroconnettivale. Van Gieson Weigert trichrome

3.3.4. Gestione della malattia

La vaccinazione è la misura profilattica d'elezione per il controllo delle malattie infettive nei pesci e numerose ricerche sono state dedicate allo sviluppo di vaccini efficaci nei confronti di Phdp per l'utilizzo in diverse specie ittiche allevate (Miccoli et al. 2019, 2021). Le formulazioni convenzionali costituite da cellule batteriche inattivate al calore o con formalina (bacterin) hanno dimostrato un'efficacia variabile in spigola e orata se somministrate per immersione o mediante iniezione intraperitoneale (IP) o per via orale (batteri contenuti in microincapsulato in calcio o microsferi di alginato rivestite di chitosano), in forma monovalente o bivalente (costituiti da bacterin di Phdp e *V. alginolyticus* o *V. anguillarum*) (Magariños et al. 1994b, 1999; Moriñigo et al. 2002; Paolini et al. 2005; Madonia et al. 2017). L'impiego di vaccini costituiti da bacterin sembra ottimale per la vaccinazione di larve a 90 giorni post schiusa, avannotti e giovanili ma anche dei riproduttori, in quanto consentirebbe di trasferire un certo grado di immunità alle larve come evidenziato in orata (Hanif et al. 2004). Vaccini costituiti da batteri attenuati

o ECPs somministrati per immersione si sono dimostrati più protettivi, in quanto inducono l'attivazione di una più intensa risposta anticorpale (IgM) a livello della mucosa branchiale e intestinale, come dimostrato in spigola (Dos Santos et al. 2001). Similmente, la somministrazione per immersione di miscele costituite da cellule inattivate ed ECPs ha indotto un buon livello di protezione nella spigola, stimolando la sintesi di IgM specifiche (Bakopoulos et al. 2003). Dall'altro lato, l'uso di adiuvanti è stato dimostrato essere utile nel potenziare l'efficacia delle formulazioni contro Phdp poiché stimolano una maggiore sintesi di anticorpi specifici rispetto ai vaccini non adiuvantati (Miccoli et al. 2021). Approcci basati sulle recenti tecniche biomolecolari e di ricombinazione del DNA sono stati utilizzati in misura molto limitata per lo sviluppo di vaccini batterici per i pesci ed al momento non sono ancora disponibili formulazioni efficaci contro la fotobatteriosi (Miccoli et al. 2019, 2021).

Oltre alla vaccinazione, l'attuazione di misure igienico-sanitarie e di biosicurezza adeguate negli allevamenti ittici, la riduzione delle cause di stress (riduzione della manipolazione) e l'immunostimolazione mediante la somministrazione di probiotici o alghe con la dieta sono risultate efficaci nella prevenzione della malattia (Couso et al. 2003; Peixoto et al. 2019; Abdala-Díaz et al. 2021; Gutiérrez Falcón et al. 2021). Inoltre, la selezione di stock di pesci geneticamente resistenti alla fotobatteriosi costituisce una potenziale strategia da perseguire al fine di ridurre la probabilità di insorgenza di questa malattia negli allevamenti ed evitare perdite economiche (Miccoli et al. 2019).

Quando la profilassi non viene applicata adeguatamente, una diagnosi precoce è essenziale per controllare i focolai di fotobatteriosi e l'applicazione di antimicrobici è inevitabile. Il trattamento tempestivo dei pesci infetti con sulfa-trimethoprim e flumequina risulta generalmente efficace per limitare la diffusione del patogeno. L'impiego di altri antibiotici quali tetracicline, sulfonamide, ampicillina, cloramfenicolo, florfenicolo ed eritromicina ha dimostrato una media/debole efficacia e sono stati documentati geni codificanti per fattori di resistenza in diversi ceppi di Phdp (Andreoni and Magnani 2014; Essam et al. 2016). Recentemente, è stata evidenziata l'attività antibatterica di estratti ottenuti da piante medicinali nei confronti di Phdp (Bulfon et al. 2014) e l'uso di altre sostanze naturali come prodotti naturali marini (MNPs) o peptidi antimicrobici (AMPs) è attualmente in fase di sperimentazione nell'ambito del progetto AdriaAquaNet e costituisce una futuribile possibile alternativa agli antibiotici convenzionali.

Riferimenti bibliografici

Abdala-Díaz, R.T., J. García-Márquez, R.M. Rico, J.L. Gómez-Pinchetti, J.M. Mancera, F.L. Figueroa, F.J. Alarcón, E. Martínez-Manzanares, M.A. Moriñigo. (2021). Effects of a short pulse administration of *Ulva rigida* on innate immune response and intestinal microbiota in *Sparus aurata* juveniles. *Aquaculture Research*, 52, 3038–3051.

Acosta, F., J. Vivas, D. Padilla, J. Vega, J. Bravo, V. Grasso, F. Real. (2009). Invasion and survival of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* in non-phagocytic cells of gilthead sea bream, *Sparus aurata* L. *Journal of Fish Diseases*, 32, 535–541.

Andreoni, F., M. Magnani. (2014). Photobacteriosis: Prevention and Diagnosis. *Journal of Immunology Research*, Article ID 7938 17, 7.

- Bakopoulos, V., A. Hanif, K. Poulos, M. Galeotti, A. Adams, G.J. Dimitriadis. (2004). The effect of *in vivo* growth on the cellular and extracellular components of the marine bacterial pathogen *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Journal of Fish Diseases*, 27, 1-13.
- Bakopoulos, V., K. Poulos, A. Adams, M. Galeotti, G.J. Dimitriadis. (2002). The effect of novel growth media on the virulence and toxicity of cellular and extracellular components of the fish pathogen *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Bulletin of European Association of Fish Pathologists*, 22, 272.
- Bakopoulos, V., D. Volpatti, L. Gusmani, M. Galeotti, A. Adams, G.J. Dimitriadis. (2003). Vaccination trials of sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.), against *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, using novel vaccine mixtures. *Journal of Fish Diseases*, 26, 77-90.
- Barnes, C.A., A.E. Ellis. (2004). Bacterial Diseases of Fish - Where do we go from here? Recent advances in understanding the virulence mechanisms of fish pathogenic bacteria. In: Current Trends in Bacterial and Viral Fish and Shrimp Diseases.
- Bulfon, C., D. Volpatti, M. Galeotti. (2014). *In vitro* antibacterial activity of plant ethanolic extracts against fish pathogens. *Journal of the World Aquaculture Society*, 45, 545-557.
- Couso, N., R. Castro, B. Magariños, A. Obach, J. Lamas. (2003). Effect of oral administration of glucans on the resistance of gilthead seabream to pasteurellosis. *Aquaculture*, 219, 99-109.
- Dos Santos, N.M.S., J.J. Taverne-Thiele, A.C. Barnes, W.B. Van muiswinkel, A.E. Ellis, J.H.W.M. Rombout. (2001). The gill is a major organ for antibody secreting cell production following direct immersion of sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) in a *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida* bacterin: an ontogenetic study. *Fish and Shellfish Immunology*, 11, 65-74.
- Do Vale, A., M.T. Silva, N.M.S. dos Santos, D.S. Nascimento, P. Reis-Rodrigues, C. Costa-Ramos, A.E. Ellis, J.E. Azevedo. (2005). AIP56, a novel plasmid-encoded virulence factor of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* with apoptogenic activity against sea bass macrophages and neutrophils. *Molecular Microbiology*, 58, 1025-1038.
- Essam, H.M., G.S. Abdellrazeq, S.I. Tayel, H.A. Torky, A.H. Fadel. (2016). Pathogenesis of *Photobacterium damsela* subspecies infections in sea bass and sea bream. *Microbial Pathogenesis*, 99, 41-50.
- Galeotti, M., V. Bakopoulos, L. D'Angelo, M.F. Manetti., M. Musetti, L. Volpelli, D. Volpatti, A. Adams. (1996). Histological, immunohistochemical and ultrastructural examination of pasteurellosis experimentally induced in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). 14th Congress of the European Society of Veterinary Pathology, Ghent, 162.
- Galeotti, M., L. Volpelli, D. Volpatti, N. Del Grano. (1995). Pasteurellosis experimentally induced in sea bass (*Dicentrarchus labrax*): histological and immunohistochemical evaluation. 17th Congress of the European Society of Veterinary Pathology, Palma De Mallorca, 51.
- Gauthier, G., B. Lafay, R. Ruimy, V. Breittmayer, J.L. Nicolas, M. Gauthier, R. Christen. (1995). Small-subunit rRNA sequences and whole DNA relatedness concur for the reassignment of *Pasteurella piscicida* (Snieszko et al.) Janssen and Surgalla to the genus *Photobacterium* as *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 45, 139-144.
- Gutiérrez Falcón, A., D. Padilla, F. Real, M.J. Ramos Sosa, B. Acosta-Hernández, A. Sánchez Henao, N. García-Álvarez, I. Rosario Medina, F. Silva Sergent, S. Déniz, J.L. Martín-Barrasa. (2021). Screening of new potential probiotics strains against *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* for marine aquaculture. *Animals*, 11, 2029.
- Hanif A., V. Bakopoulos, I. Leonardos, G.J. Dimitriadis. (2005). The effect of sea bream (*Sparus aurata*) broodstock and larval vaccination on the susceptibility by *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* and on the humoral immune parameters. *Fish and Shellfish Immunology*, 19, 345-361.
- Janssen, W.A., M.J. Surgalla. (1968). Morphology, physiology, and serology of *Pasteurella* species pathogenic for white perch. *Journal of Bacteriology*, 96, 1606-1610.
- Jung, T.S., K.D. Thompson, D. Volpatti, M. Galeotti, A. Adams. (2007). Variation in the molecular weight of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* antigens when cultured under different conditions *in vitro*. *Journal of Veterinary Science*, 8, 255-261.
- Jung, T.S., K.D. Thompson, D. Volpatti, M. Galeotti, A. Adams. (2008). *In vivo* morphological and antigenic characteristics of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Journal of Veterinary Science*, 9, 169-175.
- Madonia, A., C. Melchiorri, S. Bonamano, M. Marcelli, C. Bulfon, F. Castiglione, M. Galeotti, D. Volpatti, F. Mosca, P.G. Tiscar, N. Romano. (2011). Computational modeling of immune system of the fish for a more effective vaccination in aquaculture. *Bioinformatics*, 33, 3065-3071.
- Magariños, B., R. Bonet, J.L. Romalde, M.J. Martinez, F. Congregado, A.E. Toranzo. (1996a). Influence of the capsular layer on the virulence of *Pasteurella piscicida* for fish. *Microbial Pathogenesis*, 21, 289-297.
- Magariños, B., J.L. Romalde, J.L. Barja, Núñez S, A.E., Toranzo. (1999). Protection of gilthead seabream against pasteurellosis at the larval stages. *Bulletin of European Association of Fish Pathologists*, 19, 159-161.

- Magariños, B., J.L. Romalde, M.L. Lemos, J.L. Barja, A.E. Toranzo. (1994a). Iron uptake by *Pasteurella piscicida* and its role in pathogenicity for fish. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 2990–2998.
- Magariños, B., J.L. Romalde, M. Noya, J.L. Barja, A.E. Toranzo. (1996b). Adherence and invasive capacities of the fish pathogen *Pasteurella piscicida*. *FEMS Microbiology Letters*, 38, 29–34.
- Magariños, B., J.L. Romalde, Y. Santos, J.F. Casal, J.L. Barja, A.E. Toranzo. (1994b). Vaccination trials on gilthead seabream (*Sparus aurata*) against *Pasteurella piscicida*. *Aquaculture*, 120, 201–208.
- Miccoli, A., P.R. Saraceni, G. Scapigliati. (2019). Vaccine and immune protection of principal Mediterranean fish species. *Fish and Shellfish Immunology*, 800–809.
- Miccoli, A., M. Manni, S. Picchietti, G. Scapigliati. (2021). State-of-the-Art Vaccine research for aquaculture use: the case of three economically relevant fish species. *Vaccines*, 2021, 9, 140.
- Morinigo, M.A., J.L. Romalde, M. Chabrillon, B. Magarinos, S. Arujo, M.C. Balebona, A.E. Toranzo. (2002). Effectiveness of a divalent vaccine for gilt-head sea bream (*Sparus aurata*) against *Vibrio alginolyticus* and *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida*. *Bulletin of European Association of Fish Pathologists*, 22, 298–303.
- Paolini, A., V. Ridolfi, D. Zezza, M. Cocchietto, M. Musa, A. Pavone, A. Conte, G. Giorgetti. (2005). Vaccination trials of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) against pasteurellosis using oral, intraperitoneal and immersion methods. *Veterinaria Italiana*, 41, 137–144.
- Pellizzari, C., A. Krasnov, S. Afanasyev, N. Vitulo, R. Franch, S. Pegolo, T. Patarnello, L. Bargelloni. (2013). High mortality of juvenile gilthead sea bream (*Sparus aurata*) from photobacteriosis is associated with alternative macrophage activation and anti-inflammatory response: results of gene expression profiling of early responses in the head kidney. *Fish and Shellfish Immunology*, 34, 1269–1278.
- Peixoto, M.J., R. Ferraz, L.J. Magnoni, R. Pereira, J.F. Gonçalves, J. Caldach-Giner, J. Pérez-Sánchez, R.O.A. Ozório. (2019). Protective effects of seaweed supplemented diet on antioxidant and immune responses in European seabass (*Dicentrarchus labrax*) subjected to bacterial infection. *Scientific Reports*, 9, 16134.
- Romalde, J.L. (2002). *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*: an integrated view of a bacterial fish pathogen. *International Microbiology*, 5, 3–9.
- Snieszko, S.F., G.L. Bullock, E. Hollis, J.G. Boone. (1964). *Pasteurella* sp. from an epizootic of white perch (*Roccus americanus*) in Chesapeake Bay tidewater areas. *Journal of Bacteriology*, 88, 1814–1815.

3.4. Tenacibaculosi causata da *Tenacibaculum maritimum*

Snježana Zrnčić e Lea Vrbančić

Istituto Veterinario Croato, Laboratorio di patologia ittica

3.4.1. Agente eziologico

Tenacibaculum maritimum è l'agente eziologico di una malattia ulcerosa nota come tenacibaculosi. La malattia colpisce numerose specie ittiche marine in tutto il mondo (Toranzo et al. 2015), causando alti tassi di mortalità e aumentata suscettibilità ad altre infezioni nei pesci allevati, nonché enormi costi per il loro trattamento con un conseguente significativo impatto economico sulla maricoltura (Avendano-Herera et al. 2006).

La malattia è stata segnalata per la prima volta in Giappone nel 1977 come causa di una massiccia mortalità in *Pagrus major* e *Acanthopagrus schlegeli* in un'avannotteria (Wakabayashi et al. 1986). Il batterio, isolato dai pesci infetti, è stato inizialmente identificato come *Flexibacter maritimus*, precedentemente noto come *Cytophaga marina*. Successivamente, ne sono state analizzate le caratteristiche fenotipiche, chemio-tassonomiche e filogenetiche utilizzando sia le sequenze 16S rRNA che GyrB, quindi il batterio è stato riclassificato nel nuovo genere *Tenacibaculum* e il patogeno è stato denominato *Tenacibaculum maritimum* (Suzuki et al. 2001).

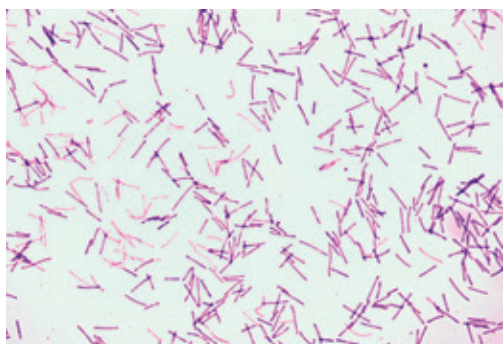


Figura 23. *T. maritimum* fissato su vetrino e colorato con colorazione di Gram

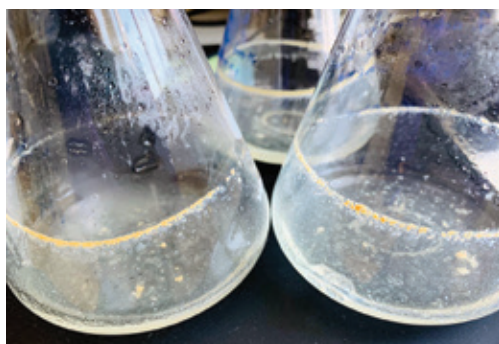


Figura 24. Formazione di biofilm sulle pareti dei recipienti usati per la coltura di *T. maritimum*

T. maritimum è un batterio filamentoso Gram-negativo, lungo 2-30 μm e con un diametro di 0,5 μm (Fig. 23), che mostra una motilità di scorrimento su superfici bagnate (Fig. 24) (Wakabayashi et al. 1986). Le colonie sono piatte, di colore giallo pallido, con margini irregolari e aderiscono fortemente al terreno per *Flexibacter maritimum* (FMM), mentre le cellule batteriche non contengono un pigmento di tipo flexirubina associato alla parete cellulare (Avendano-Herera et al. 2004).

3.4.2. Infezione e fattori ambientali

La forte aderenza al muco cutaneo e la capacità di resistere alla sua attività battericida sono indicati come possibili fattori di virulenza di *T. maritimum* (Margarinos et al. 1995). Inoltre, gli ECPs rilasciati da questo batterio possiedono un'attività proteolitica molto intensa, che ne aumenta la patogenicità. I focolai di malattia sono influenzati da una molteplicità di fattori ecologici come lo stress e l'immunosoppressione dei pesci, la variazione della salinità dell'acqua, la luce UV, la mancanza di substrato sabbioso nella vasca, l'elevata densità e la scarsa alimentazione dei pesci. La gravità e la prevalenza della malattia sembrano dipendere da una temperatura dell'acqua elevata (sopra i 15°C), una salinità compresa tra 30 e 35‰ e una bassa qualità dell'acqua (Avendano-Herera et al. 2006). Non è stata documentata alcuna specificità dell'ospite, mentre è stato ipotizzato che i pesci selvatici possano fungere da serbatoi di infezione poiché alcuni studi hanno dimostrato il coinvolgimento di meduse e pidocchi di mare come vettori di *T. maritimum* (Ferguson et al. 2010). Inoltre, la presenza cronica del batterio nello strato di muco suggerisce che questo possa rappresentare un serbatoio di infezione (Avendano-Herrera et al. 2005).

3.4.3. Aspetti clinici della malattia

T. maritimum è un patogeno opportunista che causa primariamente lesioni cutanee estese e abrasioni branchiali e successivamente infezioni sistemiche. I pesci infetti mostrano perdita di appetito, diventano letargici e presentano lesioni cutanee intorno agli occhi e sulla testa (Fig. 25-29). Le lesioni sono caratterizzate da una maggiore produzione di muco e dalla presenza di tessuto necrotico biancastro (Smage et al. 2016). I pesci con infezioni branchiali presentano un aumento della frequenza respiratoria con aree giallastre o marroni visibili sulle branchie pallide e vaste aree di grave necrosi (Mitchell and Rodger 2011). Pesci di tutte le età possono essere infettati da *T. maritimum*, ma i pesci più giovani soffrono di una forma più grave della malattia (Tobar 2015). Sulla base degli aspetti clinici sopra descritti, la malattia è anche conosciuta come "pinne sfilacciate e marciume della coda", "necrosi delle branchie e degli occhi", "malattia batterica planante del pesce di mare" e "sindrome della bocca erosa" (Toranzo et al. 2005).



Figura 25. Tipiche lesioni sulla testa di spigola affetta da tenacibaculosi



Figura 26. Tipiche lesioni su mascelle, opercoli e corpo di spigola affetta da tenacibaculosi



Figura 27. Tappeto giallo sulle branchie pallide di spigola affetta da tenacibaculosi

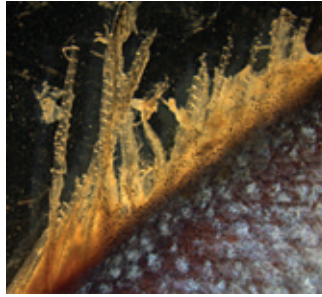


Figura 28. Pinne sfilacciate in spigola affetta da tenacibaculosi

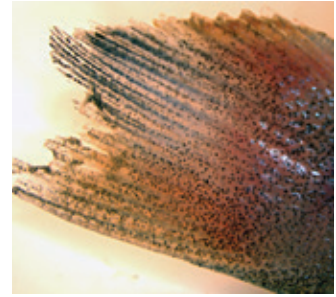


Figura 29. Marciume della coda in spigola affetta da tenacibaculosi

3.4.4. Gestione della malattia

Un unico vaccino commerciale contro *T. maritimum* è stato sviluppato per la vaccinazione per via intraperitoneale del rombo chiodato (*Scophthalmus maximus*) in Spagna; questo prodotto garantisce una percentuale relativa di sopravvivenza (RPS) soddisfacente dopo tre mesi dalla vaccinazione e protegge fino a 6 mesi (Romalde et al. 2005). Le prove sperimentali di vaccinazione con vaccini autologhi hanno mostrato risultati promettenti nell'ambito del progetto AdriaAquaNet. Attualmente, la strategia di vaccinazione utilizzata nella gestione della tenacibaculosi in Cile si basa su un priming intraperitoneale e un successivo richiamo orale per prolungare la durata dell'immunità e prevenire una reazione infiammatoria causata dall'iniezione del vaccino.

Tuttavia, gli episodi di malattia negli allevamenti ittici dovrebbero essere prevenuti implementando le GAP; ad esempio, controllando la densità dei pesci, riducendo le condizioni di stress, evitando la sovralimentazione dei pesci e i danni alla pelle dovuti alla manipolazione. In alcuni casi, il trattamento antimicrobico dei pesci è inevitabile, ma dovrebbe essere effettuato un antibiogramma per testare *in vitro* la suscettibilità dei batteri isolati agli antibiotici. Uno studio su isolati di *T. maritimum* di diverse aree geografiche ha mostrato un *pattern* simile di suscettibilità alla tetraciclina, alle sulfonamidi potenziate e ai fluorochinoloni mentre una resistenza a kanamicina, neomicina e chinoloni.

Riferimenti bibliografici

- Avenidaño-Herrera, R., Toranzo, A. E., & Magariños, B. (2006). Tenacibaculosis infection in marine fish caused by *Tenacibaculum maritimum*: a review. *Diseases of aquatic organisms*, 71(3), 255-266.
- Avenidaño-Herrera, R., Magariños, B., López-Romalde, S., Romalde, J. L., & Toranzo, A. E. (2004). Phenotypic characterization and description of two major O-serotypes in *Tenacibaculum maritimum* strains from marine fishes. *Diseases of aquatic organisms*, 58(1), 1-8.
- Ferguson, H. W., Christian, M. D., Hay, S., Nicolson, J., Sutherland, D., & Crumlish, M. (2010). Jellyfish as vectors of bacterial disease for farmed salmon (*Salmo salar*). *Journal of veterinary diagnostic investigation*, 22(3), 376-382.
- Magarinos, B., Pazos, F., Santos, Y., Romalde, J. L., & Toranzo, A. E. (1995). Response of *Pasteurella piscicida* and *Flexibacter maritimus* to skin mucus of marine fish. *Diseases of Aquatic Organisms*, 21(2), 103-108.

- Mitchell, S. O., & Rodger, H. D. (2011). A review of infectious gill disease in marine salmonid fish. *Journal of fish diseases*, 34(6), 411-432.
- Romalde, J. L., Ravelo, C., López-Romalde, S., Avendano-Herrera, R., Magariños, B., & Toranzo, A. E. (2005). Vaccination strategies to prevent emerging diseases for Spanish aquaculture. *Developments in biologicals*, 121, 85-95.
- Småge, S. B., Frisch, K., Brevik, Ø. J., Watanabe, K., & Nylund, A. (2016). First isolation, identification and characterisation of *Tenacibaculum maritimum* in Norway, isolated from diseased farmed sea lice cleaner fish *Cyclopterus lumpus* L. *Aquaculture*, 464, 178-184.
- Suzuki, M., Nakagawa, Y., Harayama, S., & Yamamoto, S. (2001). Phylogenetic analysis and taxonomic study of marine Cytophaga-like bacteria: proposal for *Tenacibaculum* gen. nov. with *Tenacibaculum maritimum* comb. nov. and *Tenacibaculum ovolyticum* comb. nov., and description of *Tenacibaculum mesophilum* sp. nov. and *Tenacibaculum amyolyticum* sp. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 51(5), 1639-1652.
- Tobar, J. (2015, February). Current situation of *Tenacibaculum* in Chile and potential prevention strategies. In *Tenacibaculum maritimum: Current Knowledge and Future Directions*. Workshop Report and Synopsis, Campbell River: CAHS workshop. pp. 11
- Toranzo, A.E. (2015, February). Tenacibaculosis of farmed fish in Southern Europe. . In *Tenacibaculum maritimum: Current Knowledge and Future Directions*. Workshop Report and Synopsis, Campbell River: CAHS workshop. pp. 8
- Toranzo, A. E., Magariños, B., & Romalde, J. L. (2005). A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. *Aquaculture*, 246(1-4), 37-61.
- Wakabayashi, H., Hikida, M., & Masumura, K. (1986). *Flexibacter maritimus* sp. nov., a pathogen of marine fishes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 36(3), 396-398.

4. Vaccinazione e strategie vaccinali

Snježana Zrnčić e Dražen Oraić

Istituto Veterinario Croato, Laboratorio di patologia ittica

4.1. Introduzione

La vaccinazione è una delle componenti chiave per una produzione sostenibile di pesci sani (Miccoli et al. 2019) ed è stata riconosciuta una misura profilattica essenziale per la riduzione dell'uso di antibiotici in acquacoltura (Adams 2019).

Dal punto di vista economico, la vaccinazione è il metodo migliore per aumentare il tasso di sopravvivenza dei pesci e la redditività dell'acquacoltura, in combinazione con altri fattori necessari per il raggiungimento delle migliori performance zootecniche, come la produzione di giovanili di alta qualità, una nutrizione adeguata, buone pratiche di allevamento e una corretta gestione sanitaria (McLoughlin 2016). La vaccinazione consente di limitare la diffusione delle malattie infettive, risparmiando sui costi, riducendo la necessità di antibiotici e altri farmaci ed evitando di conseguenza i problemi dovuti all'antibiotico-resistenza e la preoccupazione per la permanenza di residui pericolosi nell'ambiente e dei prodotti destinati al consumatore (Adams 2019).

La vaccinazione mira a indurre un'immunità a lungo termine nei confronti di uno o più patogeni, dal momento che stimola le risposte immunitarie specifiche dei pesci ed induce protezione verso una o più malattie batteriche. Un buon vaccino dovrebbe soddisfare i seguenti requisiti: i) dovrebbe essere sicuro e non tossico, ii) dovrebbe essere economicamente conveniente, iii) dovrebbe garantire una protezione a lungo termine, iv) dovrebbe proteggere i pesci nello stadio di sviluppo in cui sono più suscettibili alla malattia, v) dovrebbe essere somministrato ai pesci mediante una via di somministrazione adeguata allo sviluppo del pesce e alla tipologia di vaccino.

4.1.1. Tipi di vaccini

Di seguito viene riportata una breve rassegna delle diverse tipologie di vaccino disponibili per i pesci (Ma et al. 2019):

- 1) vaccini inattivati a cellule intere: sono vaccini preparati con agenti patogeni inattivati utilizzando diversi metodi (es. calore, formalina) e possono essere integrati con adiuvanti;
- 2) vaccini attenuati: sono vaccini modificati contenenti batteri vivi che possiedono già una ridotta virulenza naturale verso le specie ittiche di destinazione, oppure la cui virulenza può essere attenuata mediante procedure fisiche o chimiche, coltura in condizioni anomale, o mediante manipolazione genetica;

- 3) vaccini a subunità proteica: sono vaccini contenenti la sola componente antigenica del/dei patogeno/i e non si possono replicare nell'ospite, quindi non vi è il rischio di patogenicità per l'ospite o per specie non bersaglio (Hansson et al. 2000);
- 4) vaccini ricombinanti: sono prodotti attraverso la tecnologia del DNA ricombinante, cioè una porzione di DNA codificante per uno specifico antigene viene espressa in cellule batteriche o di mammifero, che vengono quindi indotte a produrre l'antigene che viene poi purificato e utilizzato per l'immunizzazione (Lorenzen 1999);
- 5) vaccini ad acidi nucleici (DNA o RNA): sono composti da DNA o RNA che codifica per l'antigene o gli antigeni di interesse; sono relativamente semplici da produrre e sicuri da somministrare poiché non possono provocare una condizione patologica nell'ospite (Ulmer et al. 2012);
- 6) vaccini sintetici: sono composti principalmente o interamente da peptidi, carboidrati o antigeni sintetici (Adams 2019).

Attualmente, la maggior parte dei vaccini disponibili in commercio per i pesci sono preparati con agenti patogeni interi che sono stati inattivati utilizzando il calore o la formaldeide. Nel caso dei batteri, ciò significa che le preparazioni contengono cellule batteriche e i loro prodotti extracellulari che fanno parte del meccanismo infettivo. I batteri vengono coltivati in terreno di coltura idoneo e successivamente disattivati. Questi vaccini possono essere o non essere adiuvantati: ad esempio, i vaccini somministrabili per via intraperitoneale sono, per lo più, adiuvati (Ribeiro 2010).

Gli adiuvanti sono agenti farmacologici o immunologici in grado di modificare l'effetto di altri agenti, come farmaci o vaccini. Quando viene somministrato insieme a un vaccino, l'adiuvante induce una più efficace stimolazione del sistema immunitario dell'individuo che è stato sottoposto alla vaccinazione e incrementa la sua risposta al vaccino. Sali di alluminio, virosomi e alcuni oli sono alcune delle sostanze comunemente usate come adiuvanti nei pesci.

Inoltre, i vaccini possono essere monovalenti o polivalenti. I vaccini monovalenti sono in grado di proteggere i pesci da un solo microrganismo mentre i vaccini polivalenti consentono di immunizzare contro due o più microrganismi diversi. In generale, sembra che i vaccini monovalenti inducano nei pesci lo sviluppo di una risposta immunitaria più intensa.

4.1.2. Somministrazione del vaccino

Tre diversi metodi di somministrazione di un vaccino possono essere utilizzati nei pesci:

- 1) vaccinazione per iniezione intraperitoneale o intramuscolare: questo metodo di vaccinazione è dispendioso in termini di tempo e lavoro, richiede attrezzature aggiuntive e operatori formati, il tempo impiegato per vaccinare un lotto di pesci è maggiore

rispetto a quello che sarebbe necessario con una vaccinazione per immersione; i pesci vaccinati devono essere di taglia adeguata ed è necessaria che siano anestetizzati per poter effettuare l'iniezione; tuttavia, la durata dell'immunità indotta è più lunga rispetto all'immunità ottenuta dopo una vaccinazione per immersione;

- 2) vaccinazione per immersione: è il metodo adatto per vaccinare avannotti e pesci di piccole dimensioni: e implica l'immersione del lotto di pesci in una miscela contenente il vaccino diluito in acqua di allevamento per un tempo stabilito; il vantaggio è che un gran numero di pesci può essere vaccinato contemporaneamente e non sono richieste particolari attrezzature rispetto a quelle normalmente utilizzate in azienda; le quantità di vaccino necessarie per vaccinare un lotto di pesci sono maggiori di quelle che sono necessarie nel caso di una vaccinazione per iniezione e l'immunità indotta ha una durata più breve;
- 3) vaccinazione orale: consiste nella somministrazione del vaccino mediante il mangime ed è il metodo di vaccinazione più semplice, non dannoso per i pesci e non richiede alcuna strumentazione o formazione specifica degli operatori; i principali ostacoli sono che la vaccinazione orale non provoca un'immunità forte e duratura, è necessario somministrare una dose di antigene maggiore rispetto a quella necessaria per la vaccinazione per iniezione o immersione al fine di ottenere un'immunità efficace nei pesci; la scarsa risposta immunitaria è dovuta al basso pH e all'alta attività enzimatica presente nell'intestino anteriore, che provocano la degradazione delle componenti del vaccino; la microincapsulazione dei batteri o degli antigeni è risultata utile per proteggerli dal danneggiamento, tuttavia la risposta immunitaria nei pesci vaccinati in questo modo non risulta così efficiente come quella derivante dalla somministrazione del vaccino per iniezione.

Gli effetti ottimali dei vaccini non dipendono solo dalla scelta del vaccino e dalla sua somministrazione, ma anche dalla specie ittica da vaccinare, dallo stato di salute dei pesci, dal ciclo di produzione, dal tipo di malattie che si desidera controllare, dal periodo in cui queste malattie si manifestano, dalla tecnologia di allevamento, dalle condizioni ambientali (temperatura, salinità), dagli eventuali fattori di stress, dal tipo di alimentazione dei pesci e dalla valutazione di costi-benefici.

Sarebbe opportuno cercare di sviluppare, tra gli allevatori, la consapevolezza che la vaccinazione è uno strumento efficace per prevenire focolai di malattie infettive (quelle contro cui i vaccini sono stati sviluppati), ma non può essere altrettanto efficiente se effettuata durante un focolaio di malattia già presente in allevamento.

Riferimenti bibliografici

-
- Adams, A. (2019). Progress, challenges and opportunities in fish vaccine development. *Fish & Shellfish Immunology*, 90, 210-214.
- Hansson, M., Nygren, P. A. K., & Stahl, S. (2000). Design and production of recombinant subunit vaccines. *Biotechnology and applied biochemistry*, 32(2), 95-107.
- Lorenzen N. 1999. Recombinant vaccines: experimental and applied aspects. *Fish & Shellfish Immunology*, 9, 361-365.

Ma, J., & Bruce, J. T., M. Jones, E. y D. Cain, K. A (2019). Review of Fish Vaccine Development Strategies: Conventional Methods and Modern Biotechnological Approaches. *Microorganisms*, 7, 569.. doi:10.3390/microorganisms7110569.

McLoughlin, M (2016). Fish Vaccination - A brief overview, Aquatic Veterinary Services Belfast. https://kipdf.com/fish-vaccination-a-brief-overview-dr-marian-mcloughlin-aquatic-veterinary-servic_5ad31cda7f8b9aa8988b459a.html (accessed online 5th February 2022)

Miccoli, A., Saraceni, P. R., & Scapigliati, G. (2019). Vaccines and immune protection of principal Mediterranean marine fish species. *Fish & Shellfish Immunology*, 94, 800-809.

Ribeiro, C., & Schijns, V. E. (2010). Immunology of vaccine adjuvants. In *Vaccine adjuvants* (pp. 1-14). Humana Press, Totowa, NJ.

Ulmer, J. B., Mason, P. W., Geall, A., & Mandl, C. W. (2012). RNA-based vaccines. *Vaccine*, 30(30), 4414-4418.

4.2. Vaccini disponibili in commercio

Tabella 2. Vaccini commerciali per l'uso nell'allevamento di spigola e orata.

Nome del prodotto	Ditta produttrice	Antigene	Modalità di somministrazione	Dose	Registrazione		
					Croazia	Italia	EU
AlphaDip Vib	PHARMAQ ZOETIS	<i>V. anguillarum</i> inattivato	Immersione rapida	1:20	sì	sì	no
AlphaJect 2000	PHARMAQ ZOETIS	<i>V. anguillarum</i> , <i>P. damselae</i> subsp. <i>piscicida</i> inattivati	Iniezione	0.1 mL	sì	no	sì
AlphaJect micro 2000	PHARMAQ ZOETIS	<i>V. anguillarum</i> , <i>P. damselae</i> subsp. <i>piscicida</i> inattivati	Iniezione	0.05 mL	sì	sì	sì
AlphaJect micro Noda	PHARMAQ ZOETIS	VNN inattivato- genotipo RGNNV	Iniezione	0.05 mL	sì	sì	sì
Icthiovac VNN	LABORATORIS HIPRA	VNN inattivato	Iniezione	0.1 mL	sì	sì	sì
Icthiovac VR	LABORATORIS HIPRA	<i>V. anguillarum</i> inattivato	Bagno 10s Bagno 1 h	1:10 1:500	no	sì	sì
Icthiovac VR/ PD	LABORATORIS HIPRA	<i>V.anguillarum</i> , <i>P. damselae</i> subsp. <i>piscicida</i> inattivati	Iniezione	0.1 mL	sì	sì	sì
Icthiovac PD	LABORATORIS HIPRA	<i>P. damselae</i> subsp. <i>piscicida</i> inattivato	Bagno 10s Bagno 1 h	1:10 1:500	sì	sì	sì
MARIMARK	BENCHMARK ANIMAL HEALTH	VNN inattivato genotipo RGNNV	Iniezione	0.1 mL	sì	no	no
VIBRIFISH VAX	FATRO	<i>V. anguillarum</i> inattivato	Immersione	1:10	no	sì	no
VIBRIFISH VAX	FATRO	<i>V. anguillarum</i> inattivato	Iniezione	0.1 mL	no	sì	no
AQUAVAC VIBRIO IMMERSION	MSD ANIMAL HEALTH	<i>V. anguillarum</i> inattivato	Immersione	1:10	no	sì	sì

Fonti:

1. Ministry of agriculture. Veterinary and Food Safety Directorate. 2022. <http://veterinarstvo.hr/default.aspx?id=140>. Accessed January 21 2022
2. Ministero della Salute. Prontuario dei medicinali veterinary versione 1.2.0. 2022. https://www.vetinfo.it/j6_prontuario/public/
3. <https://www.ema.europa.eu>

4.3. La vaccinazione in avannotteria

Dražen Oraić

Istituto Veterinario Croato, Laboratorio di patologia ittica

Marco Galeotti

Università di Udine, Dipartimento di Scienze AgroAlimentari, Ambientali e Animali

Danijel Mejdandžić

Cromaris

È noto che i pesci marini non sono in grado di produrre anticorpi fino a diverse settimane dopo la schiusa; tuttavia, essi sono dotati di meccanismi di protezione contro gli agenti patogeni derivanti dall'immunità innata (Galindo-Villegas and Mulero 2014).

Nelle avannotterie di spigola e orata, la prima vaccinazione viene solitamente effettuata quando i pesci raggiungono un peso di 1 g o poco più. A pesci di queste dimensioni, i vaccini vengono solitamente somministrati per bagno e la protezione non dura più di 4-6 mesi a causa dello sviluppo incompleto del sistema immunitario. Per questo motivo, la rivaccinazione dei pesci è necessaria una volta che hanno raggiunto una taglia maggiore e prima del loro trasferimento in gabbia; in questo caso, comunemente il vaccino viene somministrato mediante iniezione intraperitoneale.

In questo capitolo, vengono descritti i passaggi necessari per eseguire con successo la vaccinazione di branzini e orate in avannotteria. Una delle principali informazioni da tenere a mente è che solo i pesci sani svilupperanno un'immunità efficace in seguito alla vaccinazione.

Piano vaccinale e tempistiche

In linea generale, per le principali malattie batteriche del comparto marino, in base al raggiungimento di un buon livello di maturità del sistema immunitario e alle esigenze delle avannotterie i tempi e le modalità di somministrazione del vaccino prevedono le seguenti possibilità.

La **prima vaccinazione in orata e spigola** viene solitamente effettuata quando i pesci pesano tra 1 e 5 grammi, con una preferenza per 1/1,5 grammi, mediante immersione rapida (DIP).

Il **richiamo vaccinale per immersione** può essere eseguito scegliendo due tempistiche diverse:

- a) dopo circa 4 settimane dalla prima vaccinazione, quando i pesci possono aver raggiunto la taglia di 2 – 2,5 grammi; con questa modalità i costi di vaccinazione sono

più bassi in quanto la taglia del pesce è ancora contenuta, tuttavia il richiamo può richiedere l'attuazione di un secondo richiamo vaccinale per via IP, quando il pesce ha raggiunto i 15 grammi, per garantire una copertura vaccinale per circa un anno;

- b) dopo circa 10 settimane, quando il pesce raggiunge circa i 5 – 6 grammi; in questo caso il costo della vaccinazione aumenta per la maggior taglia dei pesci, ma la copertura vaccinale può essere di più lunga durata.

Il **richiamo vaccinale** può essere fatto anche tramite **iniezione intraperitoneale**. La pratica garantisce una ottima immunizzazione, ma i costi aumentano in quanto deve essere contemplato il costo della manodopera legato alla squadra dei vaccinatori. Questa modalità di richiamo può essere usata come terza vaccinazione in soggetti di circa 45 / 60 grammi, che hanno già avuto un primo richiamo per immersione a 2/2,5 gr. Oppure costituire l'unico richiamo da fare su pesci allevati in gabbia, una volta che questi hanno raggiunto almeno la taglia di 15 grammi.

Queste modalità devono essere intese come proposte, e non come schemi prefissati, in quanto la vaccinazione in campo deve essere adattata in base a molte mutevoli condizioni. L'approccio da adottare dovrà essere scelto su misura e i programmi vaccinali devono essere stabiliti sulla base di caratteristiche gestionali, strutturali, epidemiologiche proprie di ogni azienda. Andranno poi tenute in forte considerazione le problematiche sanitarie dell'impianto d'origine oltre che di quello di destinazione, al fine di scegliere lo schema vaccinale, le formulazioni da utilizzare e la eventuale possibilità di richiamo più idonee.

Una settimana prima della vaccinazione dovrebbero essere effettuati alcuni importanti controlli e azioni:

1. dovrebbe essere effettuata una valutazione approfondita dello stato di salute dei pesci, prestando attenzione a comportamento, appetito e mortalità;
2. se viene diagnosticata qualche malattia, i pesci devono essere sottoposti a terapie adeguate prima della vaccinazione;
3. mangimi contenenti prodotti immunostimolanti disponibili in commercio potrebbero essere somministrati ai pesci per una o due settimane prima della vaccinazione, in modo da potenziare la risposta immunitaria indotta dal vaccino e migliorare l'esito della vaccinazione (operazione non obbligatoria);
4. i pesci dovrebbero essere di dimensioni adeguate alla vaccinazione;
5. è necessario verificare di disporre di una quantità di vaccino sufficiente per vaccinare il numero di pesci stabilito; inoltre, il prodotto deve essere stato conservato ad una temperatura di circa 2-8°C, protetto dalla luce e non congelato;
6. la qualità della conservazione e la data di scadenza del prodotto dovrebbero essere opportunamente controllate.

Uno o due giorni prima della vaccinazione, ulteriori verifiche dovrebbero essere effettuate:

1. tutte le attrezzature che saranno utilizzate per la vaccinazione o che potrebbero venire a contatto con i pesci devono essere accuratamente lavate e disinfettate;
2. le vasche in cui i pesci saranno trasferiti dopo la vaccinazione devono essere pulite e disinfettate;
3. la procedura vaccinale dovrebbe essere accuratamente pianificata e tutto il personale incaricato dovrebbe essere a conoscenza dei suoi compiti;
4. il peso medio del lotto da vaccinare dovrebbe essere quantificato a priori (la dimensione raccomandata è da 1 a 5 grammi);
5. i pesci dovrebbero essere mantenuti a digiuno dal giorno prima della vaccinazione.

Procedura vaccinale:

1. rimuovere il vaccino dal frigorifero e lasciarlo a temperatura ambiente, scuotere la confezione e assicurarsi che il contenuto sia distribuito uniformemente;
2. subito dopo l'apertura, diluire il prodotto con acqua marina seguendo le istruzioni rilasciate dal produttore e mescolare accuratamente;
3. evitare di mescolare il vaccino con altri prodotti;
4. vaccinare i pesci in gruppi e pesarli (Fig. 30);



Figura 30. Raccolta degli avannotti dalle vasche di allevamento



Figura 31. Immersione degli avannotti nel vaccino



Figura 32. Immersione degli avannotti nel vaccino

5. gli avannotti devono permanere in immersione per il tempo indicato dal produttore del vaccino (da 30 a 60 secondi o anche di più per alcuni vaccini) (Fig. 31, 32);
6. nel momento in cui i pesci vengono spostati nel contenitore adibito alla vaccinazione, evitare di diluire ulteriormente il vaccino con acqua proveniente dalle vasche di allevamento;

7. trasferire immediatamente il lotto di pesci vaccinato in una nuova vasca pulita;
8. assicurarsi che il personale coinvolto nella vaccinazione indossi protezioni adeguate, come guanti di gomma e occhiali protettivi;
9. smaltire il vaccino e le confezioni secondo le istruzioni del produttore;
10. le avannotterie di grandi dimensioni possono utilizzare un macchinario dedicato per l'immersione dei pesci nel vaccino (Fig. 33, 34).

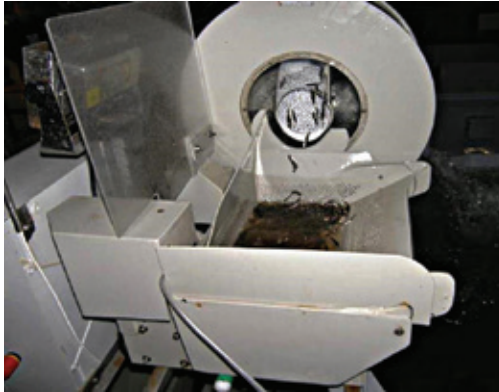


Figura 33. Raccolta degli avannotti e loro immersione nel vaccino mediante uso del macchinario dedicato



Figura 34. Trasferimento dei pesci vaccinati in una nuova vasca di allevamento mediante uso del macchinario dedicato

Dopo la vaccinazione:

1. osservare attentamente il comportamento dei pesci vaccinati e ricominciare lentamente a nutrirli il giorno successivo;
2. l'immunità inizia a svilupparsi dopo 2 settimane se i pesci vengono mantenuti a 21 ± 2 °C e dura circa 10 settimane;
3. i pesci dovrebbero essere vaccinati almeno 2 settimane prima dello spostamento dall'avannotteria alle gabbie.

Riferimenti bibliografici

Galindo-Villegas, J., V. Mulero. (2015). Current knowledge on the development and functionality of immune responses in the European seabass (*Dicentrarchus labrax*). In: Sánchez Vázquez, F.J. & Muñoz-Cueto, J.A. (eds). *Biology of European sea bass*. Taylor and Francis Group, pp 332-373.

RUMA (Responsible use of medicines in aquaculture alliance). (2006). Responsible use of vaccines and vaccination in fish production. Available at: www.ruma.org.uk.

4.4. La rivaccinazione in gabbia

Snježana Zrnčić

Istituto Veterinario Croato, Laboratorio di patologia ittica

L'immunità ottenuta mediante la vaccinazione effettuata quando i pesci sono in avannotteria dura circa 10 settimane, quindi la rivaccinazione di avannotti o giovanili è inevitabile per proteggerli anche durante l'allevamento in gabbia, quando saranno suscettibili alle malattie descritte nel primo capitolo di questo documento, ed evitare perdite economiche significative. Le perdite di pesci potrebbero essere mitigate mediante la somministrazione di farmaci antibatterici, ma molto spesso la malattia non viene diagnosticata nella sua fase prodromica (la fase in cui i pesci sono infetti ma non mostrano ancora sintomi clinici), perciò l'efficacia del trattamento farmacologico può essere incerto (Rigos et al. 2021). Quando gli allevatori notano cambiamenti nell'alimentazione, nel comportamento e nella mortalità dei pesci allevati solitamente informano il veterinario competente che avvia la procedura diagnostica mediante esame necroscopico dei pesci, campionamento di tessuti e isolamento batterico per l'identificazione del patogeno responsabile della sintomatologia e della mortalità osservate nei pesci; successivamente, richiede al laboratorio di riferimento di eseguire un test di sensibilità agli antibiotici al fine di valutare la sensibilità o resistenza del ceppo batterico isolato ai diversi farmaci e definire quello più idoneo da utilizzare per la terapia dei pesci infetti, prescrive la preparazione e l'acquisto di mangimi medicati con antibiotici e supervisiona la loro somministrazione ai pesci da parte degli allevatori e del personale dell'allevamento. Il completamento dell'intera procedura diagnostica e l'individuazione dell'antibiotico più adeguato può richiedere tempi lunghi, almeno da cinque a sette giorni, e generalmente la terapia inizia troppo tardi quando le perdite di pesci sono già molto significative (Zrnčić 2020). Inoltre, il trattamento delle malattie batteriche in acquacoltura è solitamente di tipo metafilattico, cioè finalizzato a curare sia gli animali malati che gli altri animali del gruppo per prevenire la diffusione della malattia in allevamento (FAO/OMS/OIE 2003). Tuttavia, l'uso indiscriminato di antibiotici può favorire lo sviluppo di resistenze antimicrobiche in ceppi batterici patogeni e non patogeni, l'accumulo di residui chimici nei tessuti dei pesci e nell'ambiente marino (Smith 2012). Per evitare tutte queste conseguenze indesiderate negative per la redditività dell'acquacoltura, la qualità dei prodotti finali e la salute dei consumatori e dell'ambiente, una delle procedure incluse tra le buone pratiche di acquacoltura che viene fortemente consigliata per controllare la diffusione delle malattie infettive in impianto consiste nella rivaccinazione dei pesci, precedentemente vaccinati in avannotteria, quando vengono trasferiti o allevati in gabbia.

Come avviene a seguito della vaccinazione effettuata in avannotteria, anche in questo caso solamente i pesci che risultano sani al momento della rivaccinazione in gabbia svilupperanno un'immunità ottimale contro il patogeno.

La preparazione dei pesci per l'ulteriore somministrazione del vaccino dovrebbe iniziare almeno due settimane prima della rivaccinazione pianificata:

1. dovrebbe essere effettuato un accurato esame sanitario dei pesci perché la procedura di vaccinazione stessa, potenzialmente stressante per i pesci, può favorire la comparsa di infezioni in pesci con un precario stato di salute e conseguentemente mortalità; nel caso venga rilevata una malattia (batterica o parassitaria), i pesci devono essere adeguatamente trattati prima di essere sottoposti alla re-immunizzazione;
2. i pesci potrebbero essere alimentati con mangime addizionato di immunostimolanti per alcuni giorni prima della vaccinazione (non è obbligatorio), in modo da potenziare la risposta immunitaria indotta dal vaccino;
3. i pesci dovrebbero essere mantenuti a digiuno prima di essere sottoposti alla vaccinazione, perché tollerano meglio la manipolazione e rispondono meglio agli anestetici se hanno l'apparato digerente vuoto; la durata del digiuno varia in funzione della taglia dei pesci e della temperatura dell'acqua: il digiuno può durare 24 ore se i pesci sono piccoli e la temperatura dell'acqua è alta, mentre dovrebbe durare più tempo se i pesci sono grandi e la temperatura dell'acqua è bassa;
4. la temperatura dell'acqua ottimale per la vaccinazione è 17-22°C: sarebbe opportuno non effettuare la vaccinazione quando la temperatura dell'acqua è superiore a 24°C o durante il periodo di variazione della temperatura.

4.4.1. Rivaccinazione per immersione

Snježana Zrnčić

Istituto Veterinario Croato, Laboratorio di patologia ittica

Igor Cvitić

Friškina

Un giorno prima della rivaccinazione:

1. tutte le attrezzature necessarie devono essere pulite e disinfettate (telone, ciotole di plastica per immersione, bilancia, reti, bottiglie con ossigeno, ossimetro ecc.);
2. deve essere preparata una gabbia con rete pulita per accogliere i pesci vaccinati;

3. la biomassa di pesci da vaccinare dovrebbe essere quantificata a priori in modo da preparare una quantità sufficiente di vaccino;
4. dovrebbe essere stabilito con accuratezza un piano di vaccinazione con personale addestrato, in modo che ogni persona sia istruita in merito a cosa dovrà fare e quando

Il giorno della rivaccinazione:

1. estrarre il flacone di vaccino dal frigorifero e lasciare che acquisisca la temperatura ambiente, agitarlo bene per assicurarsi che il contenuto sia uniformemente miscelato;



Figura 35. Diluizione del vaccino in acqua marina

2. diluire il vaccino subito dopo l'apertura del contenitore con acqua di allevamento secondo le istruzioni per l'uso rilasciate dal produttore del vaccino e mescolarlo accuratamente (Fig. 35): la diluizione comunemente consigliata è 1:10 (un litro di vaccino e 9 litri di acqua di allevamento) ma può variare in base al produttore del vaccino e talvolta la diluizione è 1:20; in genere un litro di vaccino è sufficiente per la vaccinazione di 100 kg di pesce di peso superiore a 5 grammi;
3. assicurarsi che il personale addetto alla vaccinazione indossi protezioni adeguate quali guanti di gomma e occhiali protettivi;



Figura 36. Accorciamento della rete della gabbia e concentrazione dei pesci da vaccinare

4. accorciare la rete della gabbia con i pesci da vaccinare in modo che questi siano concentrati (Fig. 36);



Figura 37. Posizionamento del telone all'interno della gabbia (sx) e monitoraggio dell'ossigeno (dx)

5. un telone dovrebbe essere posizionato attorno alla rete e una fornitura di ossigeno dovrebbe essere costantemente fornita e monitorata; nel caso in cui si registrasse una diminuzione della concentrazione di ossigeno, è opportuno prevederne un'implementazione (Fig. 37);
6. i pesci all'interno della rete devono essere leggermente sedati con basse dosi di anestetici;

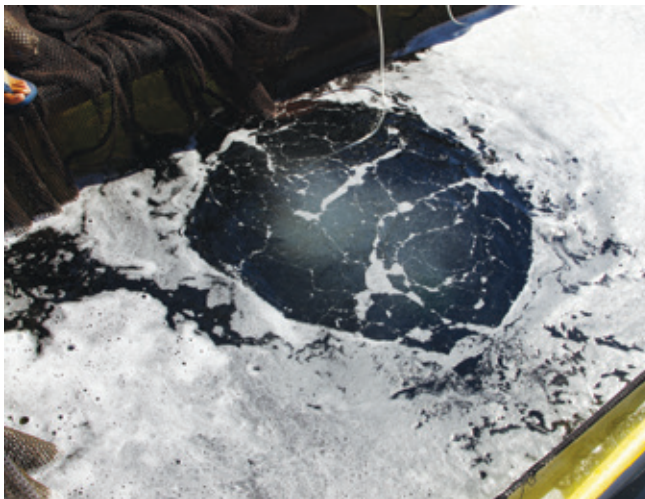


Figura 38. Raccolta dei pesci da vaccinare nel telone

7. lotti di pesce non superiori a 0,5 kg dovrebbero essere raccolti dalle gabbie o vasche di allevamento per mezzo del telone; l'acqua di contenimento dovrebbe essere scaricata prima dell'immersione dei pesci nel vaccino per evitare una sua ulteriore diluizione (Fig. 38);



Figura 39. Immersione dei pesci nel vaccino

8. i pesci dovrebbero essere immersi e mantenuti nel vaccino per almeno 30 secondi (Fig. 39);

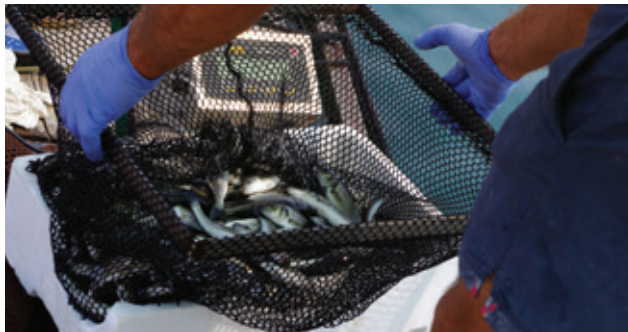


Figura 40. Pesata dei pesci dopo la vaccinazione

9. dopo la vaccinazione, la rete con i pesci deve essere pesata (Fig. 40) e poi i pesci devono essere trasferiti direttamente nella nuova gabbia (Fig. 41);



Figura 41. Rilascio dei pesci vaccinati nella gabbia di allevamento

10. il vaccino usato dovrebbe essere eliminato secondo le indicazioni del produttore.

Dopo la rivaccinazione:

1. osservare attentamente il comportamento dei pesci vaccinati e ricominciare lentamente a nutrirli il giorno successivo.

4.4.2. Rivaccinazione mediante iniezione

Dražen Oraić

Istituto Veterinario Croato, Laboratorio di patologia ittica

Danijel Mejdandžić

Cromaris

La preparazione dei pesci da sottoporre a rivaccinazione mediante iniezione è simile a quella che si effettua prima della rivaccinazione per immersione.

Solo alcuni accorgimenti aggiuntivi dovrebbero essere considerati:

1. prima della vaccinazione, i pesci dovrebbero essere classificati in base alle loro dimensioni al fine di aumentare la velocità e l'accuratezza della procedura di vaccinazione;
2. i pesci di peso inferiore a 15 g non sono adatti alla vaccinazione mediante iniezione;
3. i pesci dovrebbero essere mantenuti a digiuno per 24 ore prima della vaccinazione quando la temperatura del mare è superiore a 19 °C o 3 giorni se la temperatura del mare è inferiore a 18 °C; questo aspetto è molto importante perché la presenza di cibo nello stomaco o nell'intestino può favorire l'iniezione accidentale di vaccino nel sistema digerente del pesce;
4. il vaccino deve essere conservato a 4-8 °C.

Un giorno prima della rivaccinazione:

1. tutte le attrezzature necessarie per la vaccinazione (Fig. 42) che potrebbero venire a contatto con i pesci devono essere pulite e disinfettate (teloni, reti, tavoli, tubi, pompe, siringhe automatiche, numero sufficiente di aghi, recipienti per anestesia ecc.);



Figura 42. Attrezzature necessarie alla vaccinazione

2. se deve essere utilizzata la pistola per la vaccinazione (Fig. 43 - 44), questa deve essere preparata e utilizzata da un tecnico qualificato;
3. deve essere predisposta una gabbia con rete pulita per accogliere i pesci una volta terminate le operazioni di vaccinazione;
4. la quantità (biomassa) di pesce da vaccinare dovrebbe essere quantificata, in modo da preparare una quantità sufficiente di vaccino;
5. deve essere preparata una quantità adeguata di anestetico approvato per l'anestesia dei pesci;
6. dovrebbe essere predisposto un piano di vaccinazione con personale addestrato, in modo che ogni persona sappia cosa dovrà fare e quando;
7. la pistola per l'iniezione del vaccino deve essere accuratamente tarata;



Figura 43. Dispositivo di iniezione calibrato



Figura 44. Pistola per la vaccinazione

8. la dimensione appropriata degli aghi dovrebbe essere determinata in base alla dimensione dei pesci, allo spessore della parete addominale e al punto di iniezione: solitamente vengono utilizzati aghi lunghi 3 mm per pesci di 25-40 g, 4 mm per pesci di 40-80 g e 5 mm per quelli che pesano più di 80 g, con un diametro di 0,6 mm;
9. il personale dovrebbe avere familiarità con le procedure di sicurezza e le istruzioni in caso di auto-iniezione; se il team non è dotato di auto-iniettori di adrenalina, un medico dovrebbe essere prontamente disponibile in allevamento.

Il giorno della rivaccinazione:

1. controllare il vaccino prima dell'uso: dovrebbe apparire omogeneo dopo aver agitato il flacone (Fig. 45);
2. il vaccino deve essere tolto dal frigorifero e mantenuto a temperatura compresa tra 15 e 20 °C; dovrebbe essere protetto dalle alte temperature e dalla luce diretta;



Figura 45. Flaconi di vaccino

3. i pesci devono essere raccolti dalle gabbie/vasche di allevamento accorciando le reti e circondandole con un telone all'interno del quale deve essere garantito un apporto continuo di ossigeno (Fig. 46), inoltre devono essere sedati con un basso dosaggio di anestetici;



Figura 46. Accorciamento della rete, posizionamento del telone (sx) e raccolta dei pesci da vaccinare (dx)

4. prelevare piccoli lotti di pesci dal telone (Fig. 47) e immergerli nell'anestetico precedentemente preparato all'interno di un recipiente adeguato per 40-120 secondi (Fig. 46);
5. la soluzione anestetica deve essere periodicamente cambiata secondo le istruzioni del produttore;
6. è necessario anestetizzare un numero adeguato di pesci, in modo da consentire la vaccinazione di tutti i soggetti entro 3 minuti ed evitare perdite elevate dovute allo stress da manipolazione;



Figura 47. Sedazione dei pesci da vaccinare

7. i pesci da vaccinare devono essere sistemati su un apposito tavolo di lavoro (Fig. 48);

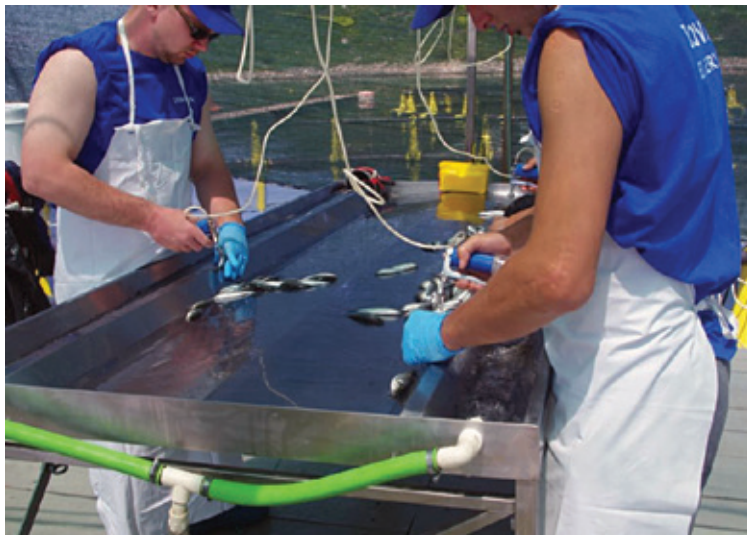


Figura 48. Posizionamento dei pesci da vaccinare sul tavolo di lavoro e somministrazione IP del vaccino

8. la velocità di lavoro deve essere regolata in base alle capacità degli operatori e la siringa deve essere posizionata con un angolo di 90 gradi rispetto alla parete addominale e sottoposta a una leggera pressione per evitare lesioni nel punto di iniezione (Fig. 48);
9. il vaccino deve penetrare senza problemi nella cavità addominale e la siringa non deve essere estratta prima che sia stata iniettata l'intera dose di vaccino;

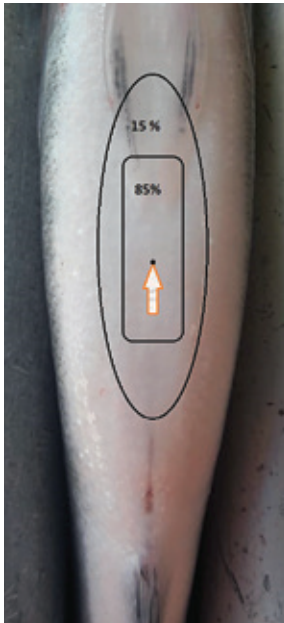


Figura 49. Punto ideale di somministrazione del vaccino mediante iniezione IP in spigola (sx) e corretto posizionamento dell'ago (dx)

10. ad esempio, il punto ideale per l'iniezione nella spigola è localizzato lungo la linea mediana a circa un cm e mezzo dalla base della pinna pelvica (Fig. 49);
11. il vaccino deve essere sempre omogeneo durante la procedura di vaccinazione;
12. una bottiglia di vaccino aperta deve essere utilizzata entro 12 ore;
13. l'ago deve essere cambiato quando è danneggiato o smussato, o dopo che 2000 pesci sono stati vaccinati;
14. le squame devono essere rimosse regolarmente dagli aghi per evitare variazioni della lunghezza dell'ago;
15. durante la vaccinazione i pesci devono essere manipolati delicatamente per evitare stress o danni (Fig. 50);



Figura 50. Lavori di routine sul tavolo di iniezione

16. gli operatori dovrebbero usare guanti puliti e cambiarli regolarmente per evitare contaminazioni;
17. l'efficacia della somministrazione del vaccino dovrebbe essere controllata mediante una leggera pressione della parete addominale del pesce nel punto di iniezione, in modo da rilevare la presenza di liquido biancastro, inoltre sarebbe utile sacrificare alcuni pesci per verificare la presenza e la quantità di vaccino presente nella cavità corporea ed eventualmente poter correggere la procedura;
18. la somministrazione inappropriata del vaccino può causare lesioni all'intestino o ad altri organi interni dei pesci;
19. dopo la somministrazione del vaccino, i pesci devono essere rilasciati nella vasca di recupero o direttamente in una nuova gabbia (Fig. 50) e dovrebbero iniziare a nuotare molto rapidamente.



Figura 51. Rilascio dei pesci nelle gabbie di allevamento dopo la rivaccinazione

Dopo la rivaccinazione:

1. i pesci dovrebbero riprendersi completamente in una settimana;
2. piccole quantità di mangime dovrebbero essere somministrate ai pesci vaccinati 1 giorno dopo la vaccinazione se questa viene effettuata durante l'estate o 2-3 giorni dopo la vaccinazione se questa viene effettuata durante l'inverno: infatti, nei giorni immediatamente successivi alla vaccinazione l'alimento transita difficilmente attraverso l'intestino, dove può fermentare causando enteriti;
3. la mortalità dopo la vaccinazione è generalmente bassa e la maggior parte dei pesci inizia a mangiare normalmente entro una settimana.

References

FAO/OIE/WHO (2003). Joint FAO/OIE/WHO Expert Workshop on Non-Human Antimicrobial Usage and Antimicrobial Resistance: *Scientific assessment*. Geneva, December, 1-5 2003.

Pharmaq Zoetis. Vaccination Manual.

- Rigos, G., Kogiannou, D., Padrós, F., Cristofol, C., Florio, D., Fioravanti, M., & Zarza, C. (2021). Best therapeutic practices for the use of antibacterial agents in finfish aquaculture: A particular view on European seabass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead seabream (*Sparus aurata*) in Mediterranean aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, 13(3), 1285-1323.
- Smith, P. (2012). Antibiotics in aquaculture: reducing their use and maintaining their efficacy. In *Infectious Disease in Aquaculture* (pp. 161-189). Woodhead Publishing.
- Zrnčić, S. (2020). Correct diagnostics: prerequisite for prudent and responsible antimicrobial administration. *Asian Fisheries Science*, 33(S1), 27-32.



PARTNER

ENTI DI RICERCA

- LP** LP UNIVERSITÀ DI UDINE
Dipartimento di Scienze Agroalimentari, Ambientali e Animali (DI4A)
- 1** ISTITUTO VETERINARIO CROATO
- 2** UNIVERSITÀ DI TRIESTE
– Dipartimento di Scienze della Vita
- 3** ISTITUTO DI OCEANOGRAFIA E PESCA
- 4** ISTITUTO ZOOPROFILATICO SPERIMENTALE DELLE VENEZIE
- 5** UNIVERSITÀ DI FIUME
Facoltà di turismo e gestione dell’ospitalità
- 6** CONSIGLIO NAZIONALE DELLE RICERCHE
tituto di chimica biomolecolare (ICB)

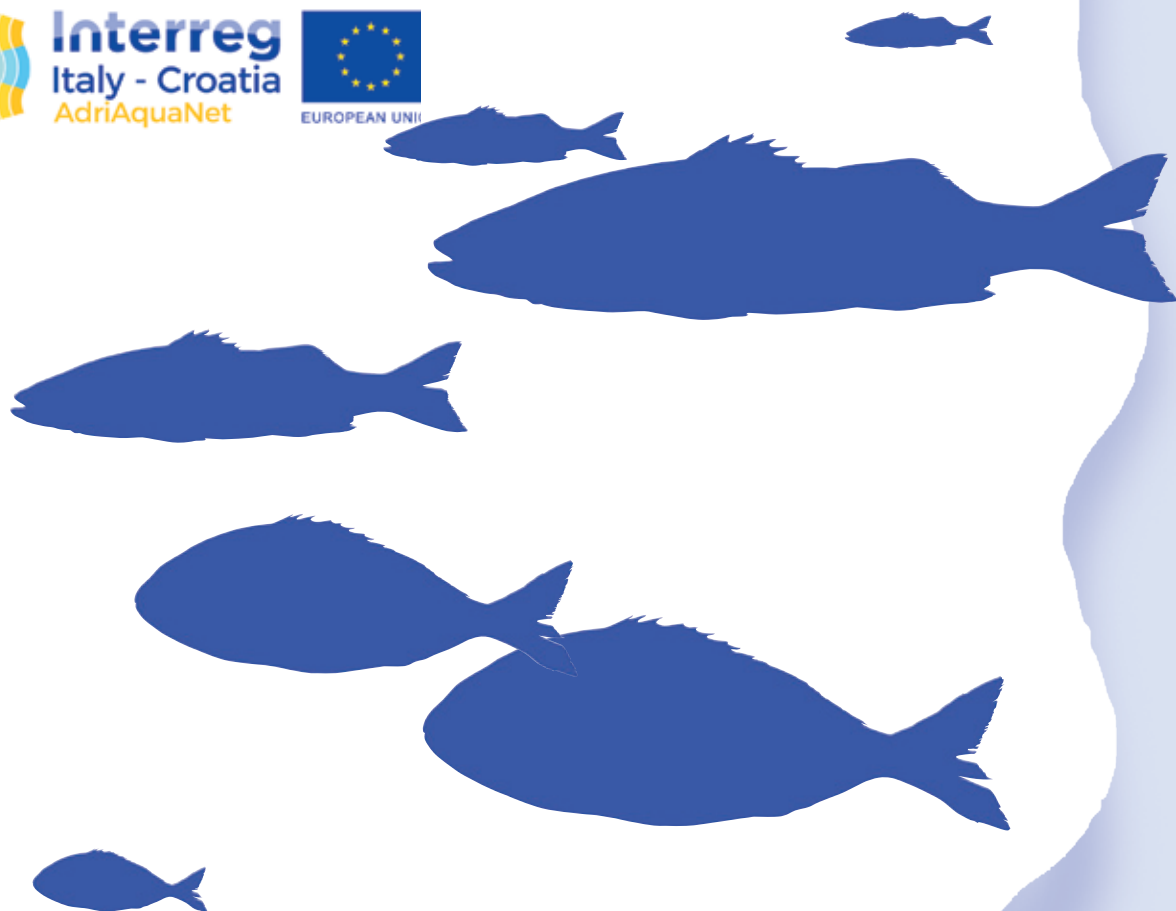
CONSORZIO

- 7** CLUSTER MARICOLTURA

PMI

- 8** FRIŠKINA S.r.l.
- 9** ITTICA CALDOLI S.a.r.l.- Poggio Imperiale
- 10** ORADA ADRIATIC S.r.l.
- 11** FRIULTROTA DI PIGHIN S.r.l.





La maricoltura adriatica fornisce prodotti ittici di alta qualità ai mercati locali ma anche ai mercati dei Paesi limitrofi. Per garantire un ulteriore sviluppo economico di questo settore e una migliore sostenibilità ambientale e sociale, scienziati e produttori da Italia e Croazia hanno sviluppato il progetto **“MIGLIORAMENTO, INNOVAZIONE E SOSTENIBILITÀ DELL’ACQUACOLTURA DELL’ADRIATICO”**.

IL CONSORZIO ADRIAQUANET è composto da scienziati di sette istituti di ricerca, quattro aziende per la produzione e la trasformazione del pesce, associazioni di allevatori da Italia e Croazia.

Le attività sono finanziate dal programma Interreg Italia-Croazia 2014-2020, fino a giugno 2022. Il coordinatore del consorzio è il prof. Marco Galeotti dell’Università di Udine, Italia.

I PARTNER HANNO DEFINITO CONGIUNTAMENTE TRE OBIETTIVI PRINCIPALI:

ALLEVAMENTO ITTICO: migliorare la maricoltura italiana e croata, introducendo innovazioni nella tecnologia per l’alimentazione dei pesci e lo smaltimento dei materiali di scarto.

SALUTE DEI PESCI: rafforzare la resistenza dei pesci allevati alle malattie infettive con nuovi vaccini, probiotici e rimedi naturali; inoltre, fornire agli allevatori uno strumento facilmente applicabile per valutare il benessere dei pesci.

MARKETING: valutare la qualità (igienica, sensoriale e nutrizionale) del pesce allevato in condizioni ecocompatibili e promozione di nuovi prodotti ittici che soddisfino le esigenze del mercato

