



PRIMA
PARTNERSHIP FOR RESEARCH AND INNOVATION
IN THE MEDITERRANEAN AREA



SUPERTROUT

Abstract book

Improving sustainability and performance of aquaculture farming system:
breeding for lactococcosis resistance in rainbow trout



SUPER TROUT

RISULTATI FINALI

03.10.2024



13.30 - 14.00: *Coffee break* di apertura

Moderatori: Prof. Marco Galeotti, UNIUD - Dr. Pier Luigi Acutis, IZSPLV

14.00: Dr. Andrea Fabris - API

Trenta anni di lattococcosi ittica: recenti aggiornamenti in Italia ed Europa

14.30: Dr. Marino Prearo - IZSPLV

Lactococcus garvieae, *L. petauri* e *L. formosensis*

15.00: Dr. Paolo Pastorino - IZSPLV

Lattococcosi ed antibiotico resistenza: confronto tra le differenti specie batteriche

15.30: Prof. Donatella Volpatti - UNIUD

Risposta della trota iridea a infezione e vaccinazione: interazione con *L. garvieae* e *L. petauri*

16.00: Dr. Silvia Colussi - IZSPLV

Genetica dell'ospite: resistenza genetica e genomica della trota iridea alla lattococcosi

16.30: Dr. Pier Luigi Acutis - IZSPLV

Discussione e saluti del coordinatore



Presso API Via Del Perlar 37/A, 37135 Verona

INTRODUZIONE

Il progetto **SUPERTROUT** è stato finanziato nell'ambito del programma **PRIMA** (Partnership for Research and Innovation in the Mediterranean Area) e si è posto quale obiettivo primario il miglioramento della sostenibilità e la redditività dei piccoli impianti trocicoli, concentrandosi sulla gestione efficace della lattococcosi. Per raggiungere questo traguardo sono stati coinvolti diversi Enti di ricerca e allevatori provenienti dai principali Paesi produttori di trota del Mediterraneo: **Italia** (con l'Istituto Zooprofilattico del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta come capofila, l'Università di Udine e l'Azienda Agricola Canali Cavour), **Spagna** (Università Complutense di Madrid-VISAVET), **Turchia** (Karadeniz Technical University) e **Grecia** (ELDO-DIMITRA). Il progetto ha adottato una strategia innovativa basata su due assi principali: la selezione di pesci resistenti tramite marker genetici e genomici, e lo sviluppo di un vaccino da somministrare per immersione.

Un aspetto chiave dello studio ha riguardato la genetica dell'ospite, valutata in diversi focolai naturali selezionati nei paesi partecipanti. Sono emersi polimorfismi del complesso maggiore di istocompatibilità associati in modo statisticamente significativo alla resistenza della trota alla lattococcosi. Nei focolai italiani, sono state inoltre osservate differenze nella risposta immunitaria tra soggetti sintomatici e asintomatici, risultati confermati anche tramite infezioni sperimentali di soggetti portatori e non di una mutazione associata alla resistenza, già individuata in studi precedenti. Lo sviluppo del vaccino, basato su subunità proteiche, ha impiegato tecniche avanzate di vaccinologia inversa per selezionare porzioni del patogeno in grado di generare una risposta anticorpale cross-protettiva per le due specie batteriche coinvolte. Parallelamente, è stato condotto uno studio dettagliato del patogeno, che ha rivelato un'elevata prevalenza di *Lactococcus petauri* (precedentemente identificato come *Lactococcus garvieae*) nell'area Mediterranea. Questo evidenzia che la lattococcosi può essere causata da entrambe le specie batteriche, che provocano sintomi identici. Inoltre, recenti studi indicano anche *Lactococcus formosensis* come possibile agente patogeno della malattia. È significativo notare che le tecniche diagnostiche biochimiche e biomolecolari convenzionali si sono dimostrate inefficaci nel discriminare tra queste tre specie. Per risolvere questo problema, è stato sviluppato un nuovo metodo, che ha permesso di riclassificare correttamente ceppi erroneamente identificati come *L. garvieae*.

La valutazione della resistenza agli antibiotici è stata un altro punto centrale del progetto. Poiché la gestione della malattia richiede l'uso di antibiotici, spesso inefficaci a causa di sintomi precoci come l'anoressia, sono stati testati 12 antibiotici per valutare la resistenza microbica e sono stati esaminati

i geni di resistenza antimicrobica (ARGs); i dati ottenuti hanno mostrato differenze tra le due specie *L. garvieae* e *L. petauri*.

Un pacchetto di lavoro specifico ha valutato l'efficacia di accoppiamenti mirati che producono prole con tassi di sopravvivenza più elevati e minori deformità larvali.

I risultati ottenuti sono promettenti, fornendo nuove opportunità per una diagnosi eziologica precisa e per l'applicazione di misure di controllo più efficaci nella gestione dei focolai di lattococcosi.



TRENTA ANNI DI LATTOCOCCOSI ITTICA: RECENTI AGGIORNAMENTI IN ITALIA ED EUROPA

Fabris A.

Direttore Associazione Piscicoltori Italiani (API), Via del Perlar, 37/A – 37135 Verona - Italy

La lattococcosi è una grave malattia di origine batterica, sostenuta da un cocco Gram positivo, *Lactococcus garvieae*, che colpisce in un'ampia gamma di pesci d'allevamento e selvatici il cui elenco è in continuo aggiornamento, in acqua dolce, salmastra e salata. La lattococcosi è stata associata anche ad altri patogeni che sono stati isolati, identificati e caratterizzati negli anni nei pesci colpiti.

Dopo le prime segnalazioni del 1991, l'infezione da *L. garvieae* è divenuta in breve tempo la principale malattia della trota iridea in Italia, Francia e Spagna. I danni economici da essa determinati sono considerevoli, manifestandosi solitamente durante il periodo estivo, in pesci all'ingrasso e di pezzatura prossima alla commercializzazione. La prevalenza della malattia è molto alta nelle trotilcolture di pianura rifornite da acque di superficie, con una mortalità del 30-50% o anche più elevata nei singoli lotti colpiti, soprattutto in concomitanza con periodi di siccità ed innalzamento delle temperature medie che dal 2003 periodicamente caratterizzano l'andamento meteo-climatico delle zone tipicamente vocate alla trotilcoltura.

La trotilcoltura italiana che aveva fatto registrare un continuo incremento fino alla fine degli anni '90, per una combinazione di fattori, tra cui la comparsa e il diffondersi di tale patologia si è ridimensionata pur rimanendo una delle principali realtà produttive nell'ambito dell'Unione Europea.

La lattococcosi ha determinato negli anni, anche grazie agli studi condotti dalla comunità scientifica e all'importante dialogo e scambio di informazioni con i produttori, una notevole mutazione della gestione sanitaria degli impianti dedicati al preingrasso e finissaggio della trota iridea. Nello specifico sono stati sviluppate ed applicate nel tempo Buone Pratiche di biosicurezza, tecniche di prevenzione, protocolli terapeutici supportati da test di farmaco-sensibilità (antibiogrammi, MIC, ecc.).

In passato la vaccinazione intraperitoneale si è rivelata un valido metodo di controllo della lattococcosi, ma negli ultimi anni, complice anche un clima molto irregolare con picchi termici fuori stagione, non sempre si è riusciti a prevenirla e si è talvolta dovuti ricorrere alla terapia che può essere effettuata somministrando mangime medicato con i chemioterapici efficaci ed utilizzabili ai sensi del quadro normativo vigente in materia (anch'esso mutato negli anni).

Lo sviluppo di vaccini, oltre che prevedere una continua valutazione dell'efficacia e riarrangiamento dei profili antigenici (anche con il ricorso a formulazioni adiuvate) ha richiesto l'attivazione di diversi Istituti di ricerca, delle industrie farmaceutiche con il supporto dell'API per ottenere autorizzazioni e registrazioni fondamentali per la produzione dei vaccini e dell'anestetico necessario per l'esecuzione della vaccinazione intraperitoneale.

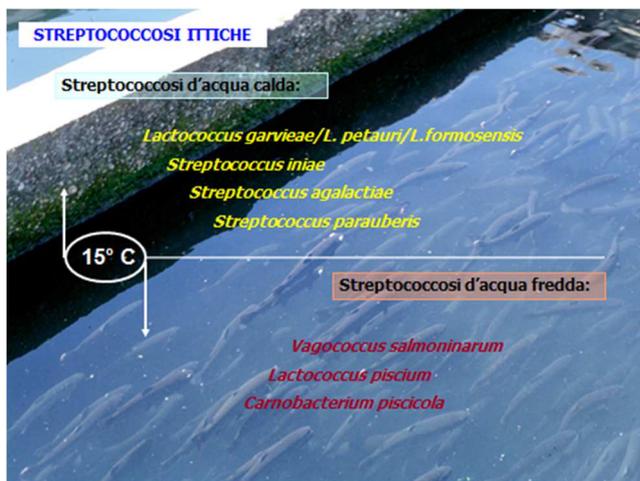
Dal 2023, si sono verificati casi di mortalità elevata anche in ambiente marino, nel Mar Mediterraneo, la lattococcosi sta determinando forti perdite in allevamenti off-shore di spigole e orate, arrivando a colpire anche allevamenti per il finissaggio del tonno rosso.

LACTOCOCCUS GARVIEAE, LACTOCOCCUS PETAURI E LACTOCOCCUS FORMOSENSIS: SPECIE DIVERSE PER UN'UNICA PATOLOGIA

Prearo M., Colussi S., Bondavalli F., Scala S., Gabetti A., Mossotto C., Esposito G., Maganza A. Bozzetta E., Acutis P.L. & Pastorino P.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Via Bologna, 148 – 10154 Torino - Italy

La lattococcosi è una patologia di origine batterica che colpisce sia specie ittiche d'acqua dolce che marine, causando una malattia ad andamento iperacuto/acuto, con una elevatissima mortalità entro breve tempo dall'insorgenza del patogeno. Da studi condotti in microcosmo, si è evidenziato come le manifestazioni sintomatologiche insorgano molto precocemente, a partire dalla comparsa veloce di anoressia completa, seguita da melanosi, esoftalmo ed atassia natatoria.

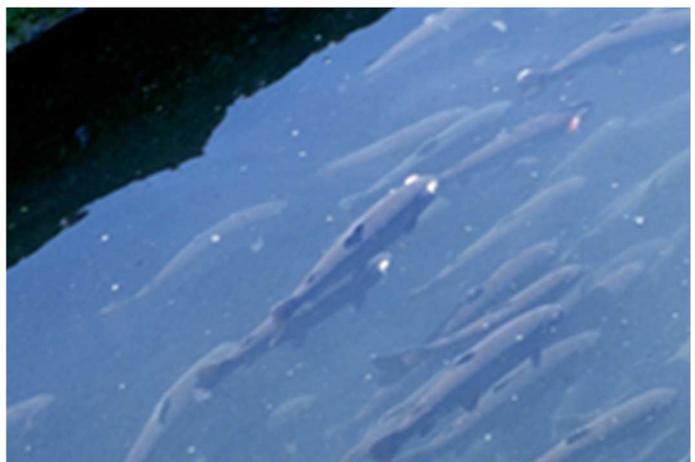


Le specie batteriche coinvolte nella lattococcosi sono oramai tre, le quali presentano manifestazioni sintomatologiche del tutto simili, ma che si diversificano oltre che a livello genetico, anche a livello antigenico e di virulenza. *Lactococcus garvieae* rappresenta la specie più conosciuta e maggiormente frequente negli episodi di malattia nei diversi continenti e fino qualche anno fa rappresentava la totalità degli isolati; con l'avvento di tecniche

biomolecolari più sofisticate, si sono potute distinguere altre due specie simili, *L. petauri* e *L. formosensis*; la prima in diverse parti del continente europeo sta soppiantando la specie progenitore nella sua diffusione, mentre la seconda non è ancora presente nel bacino del Mediterraneo e fino ad ora è stata isolata solo nel sud-est asiatico.

Osservando la situazione epidemiologica nel bacino del Mediterraneo, la lattococcosi è ampiamente distribuita sia nel comparto dulciacquicolo che in quello marino, con situazioni diverse a seconda della nazione e della tipologia di allevamento considerate. Partendo da occidente, la situazione spagnola è oramai consolidata, con la totalità degli isolati nella trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*) identificati come *L. petauri*; negli allevamenti di branzino (*Dicentrarchus labrax*) della costa mediterranea, sembra vi sia una prevalenza di *L. garvieae*, ma i dati pervenuti non hanno ancora avuto una conferma definitiva. Nella parte orientale del bacino invece, la situazione è maggiormente fluida, dove in Turchia, ad esempio, si evidenziano entrambe le specie batteriche, sia in branzino che in trota iridea. In Grecia invece, la situazione è molto omogenea e la specie predominante è *L. petauri*.

L'Italia rappresenta un'eccezione alla regola in atto, cioè quella della sostituzione di specie nella genesi della patologia. Infatti, mentre nell'intero bacino del Mediterraneo la



specie prevalente è *L. petauri*, sul territorio nazionale, nell'allevamento dei salmonidi, si ha ancora la totalità degli isolati appartenenti alla specie *L. garvieae*. La patologia prevale nell'allevamento della trota iridea, ma da alcuni anni sono stati isolati casi di lattococcosi in trota fario (*Salmo trutta*) e salmerino di fonte (*Salvelinus fontinalis*). Anche nei nuovi focolai che dal 2023 stanno colpendo gli allevamenti in gabbie galleggianti lungo la costa Tirrenica di branzini ed orate (*Sparus aurata*) è stata confermata la presenza di *L. garvieae*.

Nonostante gli episodi di malattia nelle specie ittiche sul territorio italiano siano tutti riconducibili alla specie *L. garvieae*, sono già stati identificati in ambiente delle presenze spot di *L. petauri*. Oltre ad essere già stato isolato in uomo e cane, la specie è stata identificata anche in persico sole (*Lepomis gibbosus*) e trota iridea asintomatici.

La lattococcosi si sta inoltre espandendo negli allevamenti marini di altre nazioni che si affacciano nel Mediterraneo, ma la situazione epidemiologica in questi paesi non è ancora del tutto conosciuta ed è in continua evoluzione.

Sono state evidenziate delle differenze di virulenza e della composizione genetica delle tre specie batteriche, tanto da permettere una differenziazione abbastanza grossolana, ma esauriente sulla specificità di ospite e sulla loro risposta. Infatti, mentre *L. formosensis* non è mai stato finora isolato in trota iridea, può colpire l'uomo ed essere presente nel bovino in alta percentuale; *L. petauri* invece, è predominante negli episodi morbosi in trota iridea e si isola con maggior frequenza nell'uomo, causando anche fenomeni di endocardite. *L. garvieae* infine viene identificato in circa un quinto degli isolati umani e di trota iridea; nei bovini, queste due ultime specie vengono isolate in percentuali inferiori al 10%. Nelle altre specie di animali in cui si sono verificati episodi di lattococcosi o semplici isolamenti batterici, la percentuale di presenza delle specie in oggetto sono abbastanza simili, con una piccola prevalenza verso *L. petauri*. Per quanto riguarda gli studi condotti in questo progetto si è evidenziato come *L. garvieae* risulti molto più aggressivo rispetto a *L. petauri*, causando la malattia dopo iniezione intraperitoneale in modo più repentino e l'insorgenza è taglia indipendente.

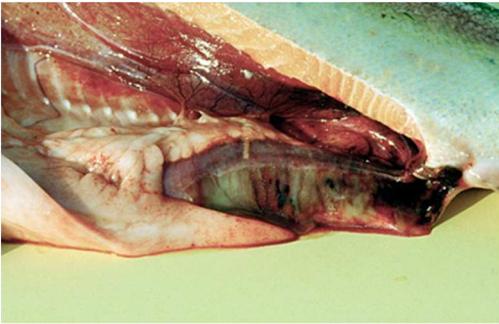


Il quadro sintomatologico della patologia è del tutto simile nelle tre specie batteriche considerate; ad una precocissima anoressia, si osserva in vasca un evidente esoftalmo, melanosi ed atassia natatoria, con gli individui colpiti che nuotano vicino ai bordi della vasca in modo lento e poco reattivo. L'esoftalmo è estremamente evidente, con evidente protrusione dei globi oculari, la quale permette di evidenziare il grasso retrobulbare che spesso è emorragico. Sono frequenti fenomeni di cheratite e

spesso si ha la rottura dei globi oculari per evidenti sollecitazioni di abrasione, fino alla completa perdita dell'occhio. All'apertura della cavità addominale si evidenzia un quadro emorragico generalizzato, con evidenti emorragie a tutti gli organi, soprattutto fegato, vescica natatoria e grasso periviscerale; è inoltre evidente splenomegalia ed un interessamento del tratto intestinale con fenomeni di enterite, da catarrale ad emorragica e con quadri di prolasso intestinale dall'apertura anale. La morte



sopraggiunge velocemente dopo qualche giorno dalla comparsa dei primi sintomi ed il tasso di mortalità varia molto anche in base alla temperatura dell'acqua, ma raggiunge sempre percentuali molto elevate (> 50%).



La terapia appare abbastanza difficile da gestire, in quanto la comparsa della precoce anoressia vanifica spesso l'effetto del mangime medicato somministrato; inoltre, l'uso di antibiotici spesso risulta ulteriormente insoddisfacente per la comparsa di veloci ricadute in ambiente infetto dei soggetti trattati, di possibili fenomeni

di antibioticoresistenza e delle condizioni precarie dei soggetti trattati che si trovano in un habitat con temperature spesso non ottimali per la specie e condizioni di stress che rendono particolarmente precarie le condizioni dei pesci.

Allora deve venire in soccorso la profilassi che, se ben gestita e programmata, può migliorare le condizioni in vasca dei soggetti, con un beneficio tangibile; oltre alle norme di biosicurezza che devono essere sempre gestite dall'allevatore, è bene approntare anche modifiche nella gestione delle diverse partite di pesce presenti nell'allevamento, utilizzando ed ottimizzando diverse pratiche di igiene zootecnica che possono essere impiegate nelle diverse realtà imprenditoriali. Poi, oltre ad utilizzare la profilassi diretta che da sola non consente sempre un'efficace metodo di lotta alle malattie, è necessario gestire l'emergenza con l'utilizzo della profilassi indiretta, tramite la vaccinazione dei soggetti, usando sia i vaccini commerciali presenti sul mercato che le preparazioni di vaccini stabulogeni prodotti dagli IZZSS con gli isolati prelevati direttamente dagli allevamenti. Anche l'uso del vaccino deve essere gestito in modo consapevole e programmare le azioni necessarie in modo preventivo; tutte le valutazioni che devono essere fatte per avere una gestione oculata della problematica, sono condotte in base alle esigenze dell'allevatore e del mercato, in base alla tipologia di allevamento, di risorsa idrica presente e della taglia dei pesci da vaccinare, in modo da programmare quale formulazione sia migliore per le esigenze dell'impianto e quale possa essere la tempistica più adatta nell'effettuazione della somministrazione del vaccino.

Purtroppo, in questi anni si è visto che la programmazione non sempre è ben condotta e spesso si incorrono in insuccessi vaccinali anche per errori gestionali evidenti e grossolani.

Resta da ricordare che la vaccinazione non può essere considerata come la soluzione definitiva alla problematica, ma un valido aiuto nella gestione della patologia e che l'attenta programmazione degli interventi e l'utilizzo accorto dei principi di igiene zootecnica, potranno coadiuvare l'azione preventiva nei confronti della lattococcosi.

Ecco perché, con il progetto SUPERTROUT, abbiamo indagato insieme a tutti i partner del consorzio di ricerca anche altri aspetti, quali una migliore conoscenza sull'immunologia, una valutazione della resistenza genetica alla malattia ed un'evoluzione nella vaccinazione, per cercare di conoscere meglio questi patogeni e fornire risultati tangibili e fruibili agli allevatori.

LATTOCOCCOSI ED ANTIBIOTICO RESISTENZA: CONFRONTO TRA LE DIFFERENTI SPECIE BATTERICHE

Pastorino, P.¹, Çağrı Öztürk, R.², Bondavalli, F.¹, Gabetti, A.¹, Maganza, A.¹, Mossotto C.¹, Altinok I.², Colussi, S.¹, Bozzetta, E.¹, Prearo, M.¹

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Via Bologna, 148 – 10154 Torino, Italy; ² Faculty of Marine Sciences, Karadeniz Technical University, Camburnu Trabzon, Turkey.

L'antibiotico-resistenza è un problema sempre più rilevante nell'acquacoltura, un settore cruciale per la produzione alimentare globale. L'uso eccessivo e spesso inappropriato di antimicrobici, sia a scopo preventivo che terapeutico, ha portato alla selezione di batteri resistenti non solo nelle specie ittiche target, ma anche nell'ambiente acquatico circostante. Questo fenomeno riduce l'efficacia dei trattamenti, facilitando la diffusione di geni di resistenza tra i batteri e aumentando il rischio di fallimenti terapeutici. Inoltre, la trasmissione orizzontale di geni di resistenza tra ceppi batterici diversi rappresenta una minaccia anche per la salute umana e animale.

Nel caso della lattococcosi, la resistenza agli antimicrobici è un problema particolarmente rilevante. *Lactococcus garvieae* è stato tradizionalmente considerato l'agente eziologico principale della lattococcosi, ma studi recenti hanno identificato *L. petauri* come una specie emergente, responsabile di focolai in Spagna, Grecia e Turchia. Questi batteri causano gravi perdite economiche nelle produzioni ittiche, soprattutto a temperature dell'acqua elevate, con conseguente aumento della mortalità nei pesci allevati.

Tale studio ha avuto l'obiettivo di confrontare la resistenza antimicrobica tra *L. garvieae* e *L. petauri*, isolati da allevamenti di trota iridea in Turchia, Italia, Spagna e Grecia, nel periodo compreso tra il 2003 e il 2022. Sono stati analizzati complessivamente 110 isolati (32 di *L. garvieae* e 78 di *L. petauri*) per determinare i *cut-off* epidemiologici (ECV) di 14 antimicrobici e per valutare la presenza di geni di resistenza agli antibiotici (ARG).

I risultati hanno evidenziato che *L. petauri* tende a essere più resistente agli antimicrobici rispetto a *L. garvieae*. I valori di MIC (Concentrazione Minima Inibente) per i vari antimicrobici differivano significativamente tra le due specie, con *L. petauri* che ha mostrato valori più elevati per antibiotici come cloramfenicolo, eritromicina, gentamicina e penicillina. Gli ECV sono stati calcolati utilizzando due approcci distinti: ECOFFinder e NRI (Normalized Resistance Interpretation). Gli ECV calcolati con ECOFFinder tendevano ad essere più elevati rispetto a quelli ottenuti con NRI, suggerendo criteri più rigorosi per la classificazione dei ceppi batterici "wild-type" (WT), ossia quelli che non presentano resistenza acquisita agli antibiotici e ceppi "non-wild-type" (NWT), che hanno sviluppato meccanismi di resistenza.

L'analisi genetica ha rivelato la presenza di diversi geni di resistenza agli antibiotici. I geni più frequentemente riscontrati includevano quelli associati alla resistenza ai chinoloni (*gyrA* e *qnrA*) e agli aminoglicosidi (*strB*). La resistenza alle tetracicline, ai β -lattamici e ai macrolidi era meno diffusa, con geni come *tetA*, *blaSHV*, *blaTEM* e *ermA* rilevati in meno del 10% degli isolati. Le cassette genetiche di classe 1 e 2, che facilitano la trasmissione orizzontale dei geni di resistenza, erano presenti rispettivamente nel 40,9% e 33,6% delle isolate, con una piccola percentuale che conteneva entrambe le cassette.

In conclusione, questo studio ha fornito nuove informazioni sulla resistenza antimicrobica di *L. garvieae* e *L. petauri*, evidenziando differenze significative tra le due specie e sottolineando la

necessità di strategie terapeutiche ottimizzate per controllare efficacemente la lattococcosi negli allevamenti ittici.

Questi risultati sono fondamentali per migliorare la sorveglianza della resistenza antimicrobica e ridurre l'impatto della diffusione dei batteri resistenti.

RISPOSTA DELLA TROTA IRIDEA A INFEZIONE E VACCINAZIONE: INTERAZIONE CON *LACTOCOCCUS GARVIEAE* E *LACTOCOCCUS PETAURI*

Saccà E.¹, Khalil S.M.I.¹, Bagatella P.¹, Mamun M.A.A.¹, Sumon T.A.¹, Esposito G.², Montemurro V.², Pezzolato M.², Bozzetta E.², Kotzamanidis C.³, Galeotti M.¹, Volpatti D.¹

¹ Dipartimento di Scienze Agroalimentari, Ambientali e Animali, Università degli Studi di Udine; Via Sondrio, 2/A – Udine, Italia; ² Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Via Bologna, 148 – 10154 Torino, Italia; ³ Veterinary Research Institute, Hellenic Agricultural Organization/Veterinary Research Institute ELGO-DIMITRA, Thessaloniki, Grecia.

La lattococcosi causata da *Lactococcus garvieae*, ora anche da *Lactococcus petauri*, è emersa come una delle malattie batteriche più impattanti nella produzione intensiva di trota iridea (*O. mykiss*). Comprendere la risposta immunitaria nei confronti di questi patogeni è fondamentale per la diagnosi e la gestione dell'infezione, ma anche per lo sviluppo di vaccini e di altre misure preventive, come selezione e allevamento di linee di trota naturalmente resistenti. Negli ultimi decenni, gli studi scientifici si sono concentrati sull'identificazione di fattori di virulenza/antigenicità batterica e sull'interazione ospite-patogeno, anche in specie ittiche diverse. Tuttavia, la distribuzione geografica della malattia e la sua diffusione nel tempo, le vie di ingresso/diffusione del batterio all'interno dell'organismo, la progressione dell'infezione e la conseguente risposta immunitaria non sono ancora stati completamente esplorati e meritano ulteriori approfondimenti.

Particolare attenzione dovrà essere dedicata alla comprensione di come i parametri immunitari e il processo infiammatorio difensivo risultino modulati quando la trota iridea viene esposta a trattamenti di vaccinazione, o alternativamente ad infezioni spontanee o indotte in modo sperimentale. Questo approccio è stato proposto e applicato proprio nel corso del progetto di ricerca PRIMA SUPERTROUT. In questo contesto UNIUD, in collaborazione con IZSPLV, ha studiato il profilo dei parametri di immunità innata e specifica in stock ittici ospitati in impianti di trotiltura intensiva, dopo la vaccinazione intracelomatica e in corso di infezione spontanea da *L. garvieae*. Similmente ha analizzato, in un contesto sperimentale (stabulario IZSVe), la risposta di linee di trota (selezionate per resistenza/suscettibilità) all'infezione intraperitoneale con *L. garvieae* o con *L. petauri*.

Il monitoraggio svolto in campo confrontando soggetti vaccinati asintomatici e soggetti non vaccinati asintomatici e sintomatici, ha evidenziato nei sieri del primo gruppo un maggiore livello di proteine totali, IgM totali, IgM specifiche per *L. garvieae* (Fig. 1).

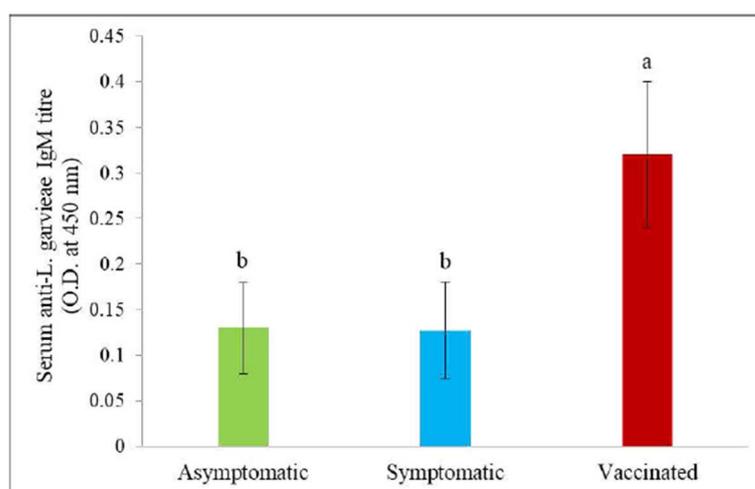


Fig. 1. Livello di anticorpi specifici anti *L. garvieae*, rilevato mediante ELISA, in sieri di trote iridea non vaccinate asintomatiche, non vaccinate sintomatiche e vaccinate. Dati rilevati presso una troticoltura intensiva. Lettere diverse indicano differenze significative tra i gruppi.

Confrontando trote sintomatiche e asintomatiche il pattern di modulazione dei geni è apparso simile nel rene anteriore e nella milza, i principali organi responsabili dell'immunità. In particolare, MHCII e IgM sono apparsi sovraespressi negli asintomatici rispetto ai sintomatici, mentre IL8 è apparso sovraespresso nei soggetti sintomatici (Fig. 2). In sintesi, il profilo di risposta genica durante l'infezione spontanea è risultato simile nel distretto immunitario centrale (rene anteriore) e nel distretto viscerale (milza). Possiamo ipotizzare che la trota affetta da lattococcosi, attraverso l'espressione di IL-8, reagisca all'infezione con una risposta infiammatoria acuta, mirata al reclutamento di cellule aspecifiche con funzione fagocitaria. In alternativa, la trota asintomatica, mediante l'espressione di MHCII e IgM, si oppone all'invasione batterica utilizzando meccanismi raffinati e più specifici, come la presentazione dell'antigene e la sintesi anticorpale.

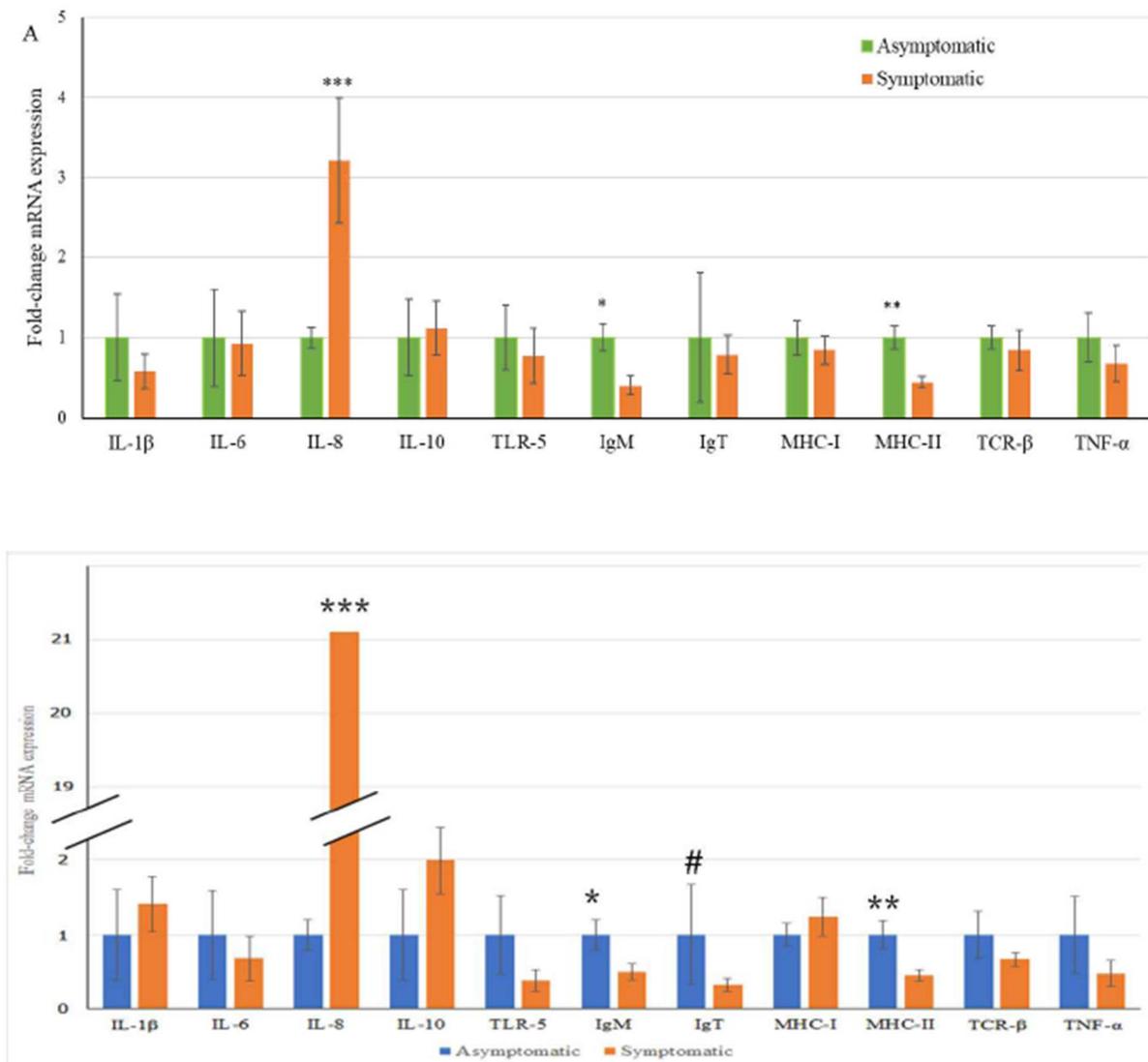


Fig. 2. Incremento dell'espressione di geni associati all'immunità nel rene anteriore (grafico in alto) e nella milza (grafico in basso) di trote iridea sintomatiche e asintomatiche. Gli asterischi indicano differenze significative tra i gruppi.

Gli esperimenti *in vivo* condotti più recentemente, utilizzando un modello di infezione sperimentale (challenge intracelomatico) in condizioni controllate, hanno permesso di studiare il profilo immunitario di trote suscettibili e resistenti verso *L. garvieae* e *L. petauri*. L'esito del challenge con *L. garvieae* (100 UFC/soggetto) è stata una infezione iperacuta, confermata nella sua progressione da coerenti riscontri batteriologici ed ematologici. La parte più importante dal punto di vista analitico è stata lo studio di espressione su un pannello di 12 geni ritenuti significativi per valutare la "risposta di fase acuta" della trota iridea nei confronti del patogeno. Parte di questi geni erano stati già studiati nella milza e nel rene anteriore di trote in corso di infezione spontanea, in particolare IL-8 e MHCII. Altri geni (enzimi pro-infiammatori, proteine di fase acuta, fattori del complemento, caspasi) sono stati per la prima volta analizzati in questa esperienza sperimentale a livello di rene anteriore/milza/fegato/tessuto adiposo addominale, evidenziando una loro importante modulazione, passando dal primo giorno al terzo post-infezione, ovvero passando da una condizione pre-setticemica a una condizione setticemica. Questo interessante pattern di espressione genica evidenzia una complessa rete di interazioni molecolari che regolano la risposta immunitaria della trota iridea nel corso dell'infezione. Tuttavia, in base alle nostre osservazioni attuali, non sono presenti marcate differenze di risposta genica al batterio tra soggetti ritenuti resistenti o suscettibili alla malattia, molto probabilmente a causa della repentina progressione dell'evento infettivo ottenuto sperimentalmente. L'infezione sperimentale condotta alternativamente con *L. petauri* non ha indotto un processo infettivo clinicamente tangibile, pur applicando una dose batterica più elevata (1×10^5 UFC/soggetto) rispetto a quella di *L. garvieae*. Anche in questo caso lo studio di espressione genica è stato condotto nei 4 organi sopra citati, con un panel di 12 geni rilevanti dal punto di vista immunitario/infiammatorio, e le analisi sono attualmente in corso.

Nell'ambito di entrambe le infezioni sperimentali la presenza batterica a livello degli organi è stata monitorata tramite istologia, eventualmente integrata dall'applicazione della tecnica RNA-scope per l'individuazione di acido nucleico riferibile al batterio (Fig. 3).

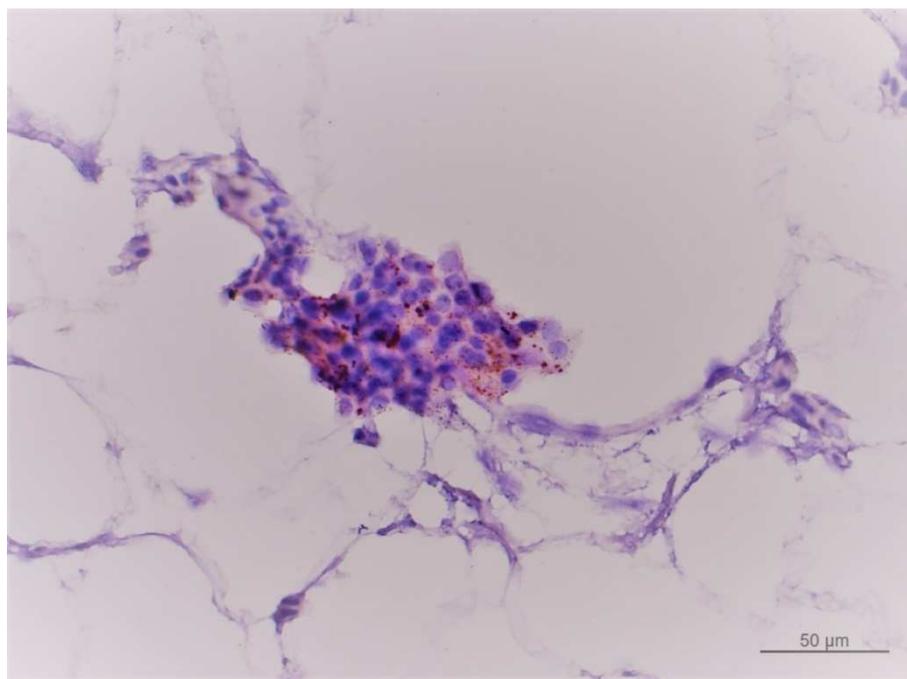


Fig. 3. *L. garvieae* rilevato tramite ibridazione *in situ* (RNA-scope) nel tessuto adiposo viscerale di una trota iridea sottoposta a infezione sperimentale.

Il progetto PRIMA SUPERTROUT ha anche contemplato attività preliminari ed esplorative finalizzate allo sviluppo di vaccini di nuova generazione contro la lattococcosi. Questa parte è stata svolta dall'unità di ricerca dell'Università di Salonicco (Grecia) ed è tuttora in avanzamento. I ricercatori coinvolti hanno applicato un approccio di “reverse vaccinology” per la sintesi di sub-unità antigeniche di *L. petauri* da utilizzare come immunogeni in una futura formulazione vaccinale cross-protettiva per le due specie (Fig. 4), inoltre hanno gettato le basi tecnologiche per la produzione di un vaccino orale micro-incapsulato in alginato, da integrare nel mangime destinato alla trota iridea.

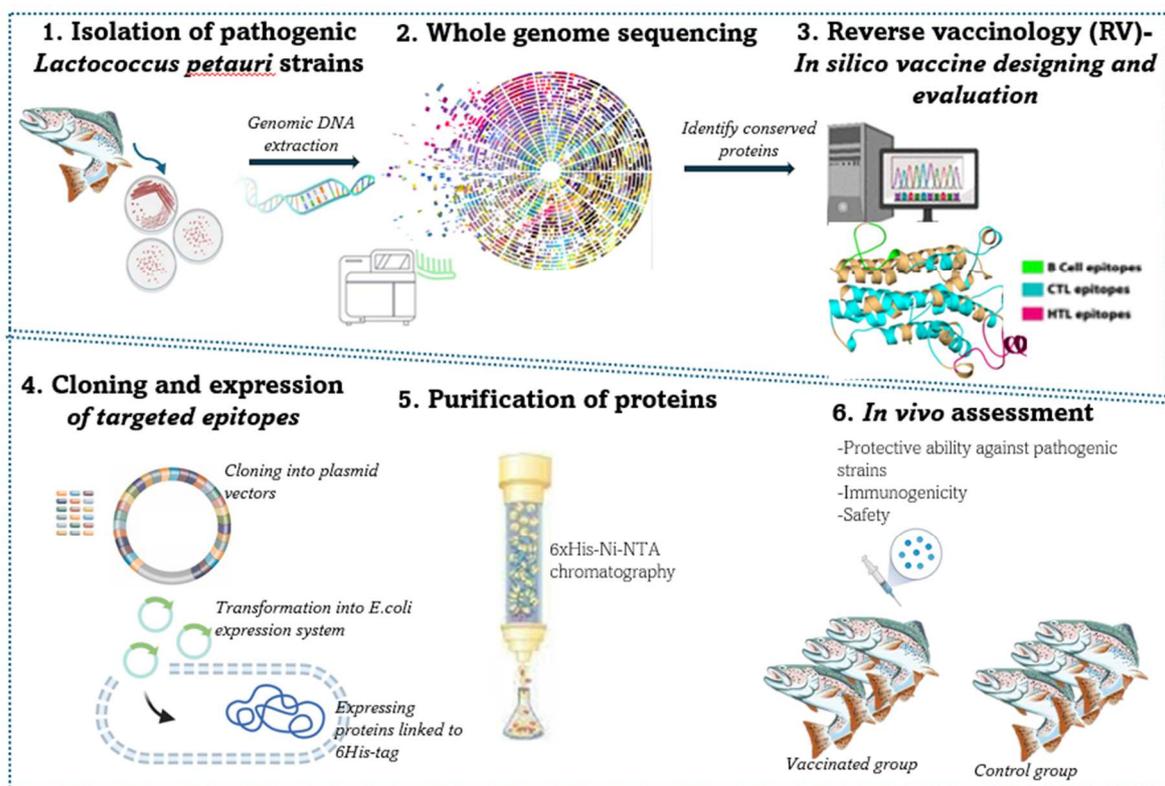


Fig. 4. Approccio basato sulla “reverse vaccinology” per la selezione e sintesi di sub-unità immunogene da *L. petauri*.

GENETICA DELL'OSPITE: RESISTENZA GENETICA E GENOMICA DELLA TROTA ALLA LATTOCOCCOSI

Colussi S.¹, Martelli W.¹, Sciuto S.¹, Fariano L.², Milanese G.¹, Gini M.¹, Ru G.¹, Volpatti D.³, Colli L.⁴, Riccioni G.⁴, Ajmone-Marsan P.⁴, Acutis P.L.¹

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Via Bologna, 148 – 10154 Torino, Italy; ²Azienda Agricola Canali Cavour, Regione Sagnassi – 12044 Centallo (CN), Italy; ³Dipartimento di Scienze Agroalimentari, Ambientali e Animali, Università degli Studi di Udine; Via Sondrio, 2/A – Udine, Italia; ⁴Università Cattolica del Sacro Cuore, Via Emilia Parmense, 84 – 20122 Piacenza, Italy.

La gestione e il contenimento delle malattie infettive rappresentano una delle principali sfide per uno sviluppo sostenibile dell'acquacoltura. La lattococcosi, caratterizzata da un'elevata mortalità, ha un impatto economico molto forte sulle produzioni d'acquacoltura d'acqua dolce e di recente marina. L'avvento di sistemi tecnologici rapidi ha reso disponibili interi genomi di numerose specie ittiche di notevole interesse economico. Si sono così moltiplicati gli studi sperimentali riportanti i dati relativi all'associazione tra determinati marcatori genetici/genomici e la resistenza alle malattie; alcuni di essi hanno condotto alla produzione di linee commerciali di salmonidi resistenti a infezioni di natura batterica, virale o parassitaria.

Un modello finalizzato al controllo della lattococcosi, basato sulla selezione genetica e genomica, sarebbe pertanto auspicabile nel breve periodo.

Nel progetto SUPERTROUT sono stati utilizzati due differenti approcci: un approccio gene-candidato basato sul gene MHC di classe II, andando a verificare il suo coinvolgimento, nella resistenza alla lattococcosi ed un approccio genomico che prevede di verificare il coinvolgimento di diverse regioni di interesse, distribuite a livello di tutto il patrimonio genetico della trota.

Ciò è stato possibile selezionando un allevamento con un'elevata prevalenza di lattococcosi, seguendo lo sviluppo dell'infezione naturale e confrontando, a livello genetico e genomico, i soggetti deceduti e quelli sopravvissuti.

Differenti varianti del gene MHC sono risultate protettive verso la lattococcosi in Italia, ma solo per alcune di esse ne è stata confermata l'importanza anche in altri Paesi partner di SUPERTROUT.

L'infezione sperimentale con *Lactococcus garvieae* in linee genetiche di trota, definite come suscettibili e resistenti, sulla base della variante 140T individuata in un precedente studio, ha evidenziato un aumento dell'espressione di alcuni parametri immunitari quali l'Interleuchina 8, le molecole del sistema maggiore di istocompatibilità di classe II (MHCII) e le proteine di fase acuta.

Lo studio di 57.000 varianti distribuite su tutto il genoma della trota, attraverso sistemi disponibili in commercio, ha evidenziato in primis come le popolazioni analizzate (Italia, Turchia, Grecia e Spagna) abbiano mostrato differenze genetiche tra loro; in particolare la popolazione turca si è ripartita in due gruppi distinti all'interno dei quali si sono collocati separatamente i soggetti deceduti e i sopravvissuti. Lo studio di associazione a livello genomico non ha invece rilevato markers significativamente associati a resistenza alla malattia.

Facendo tesoro dei risultati ottenuti con SUPERTROUT, verranno condotti ulteriori approfondimenti attraverso il programma di filiera RESILTROUT, testando un numero maggiore di soggetti provenienti da una stessa popolazione omogenea ed uniformemente esposta al patogeno.

Gli stessi sistemi commerciali utilizzati in SUPERTROUT e RESILTROUT per la genotipizzazione della trota sono, ad oggi, disponibili anche per il branzino e questo tipo di studi può quindi essere

traslato su altre specie al fine di trovare sistemi di controllo alternativi alla vaccinazione e ai trattamenti con antibiotici.

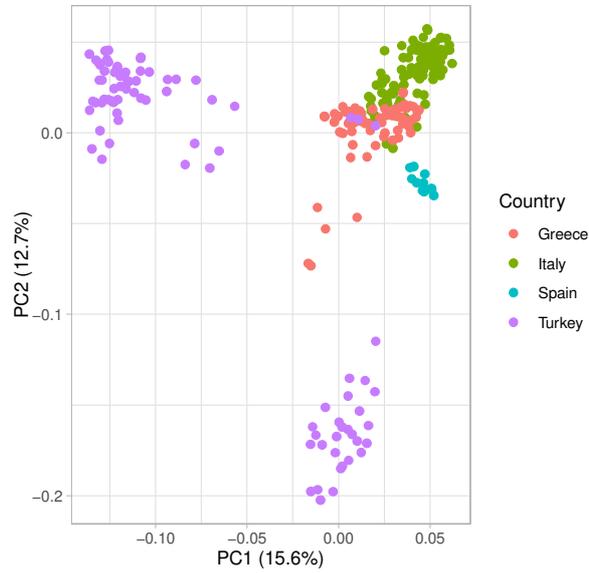


Figura 1: distribuzione delle popolazioni di trota sulla base della variabilità genetica

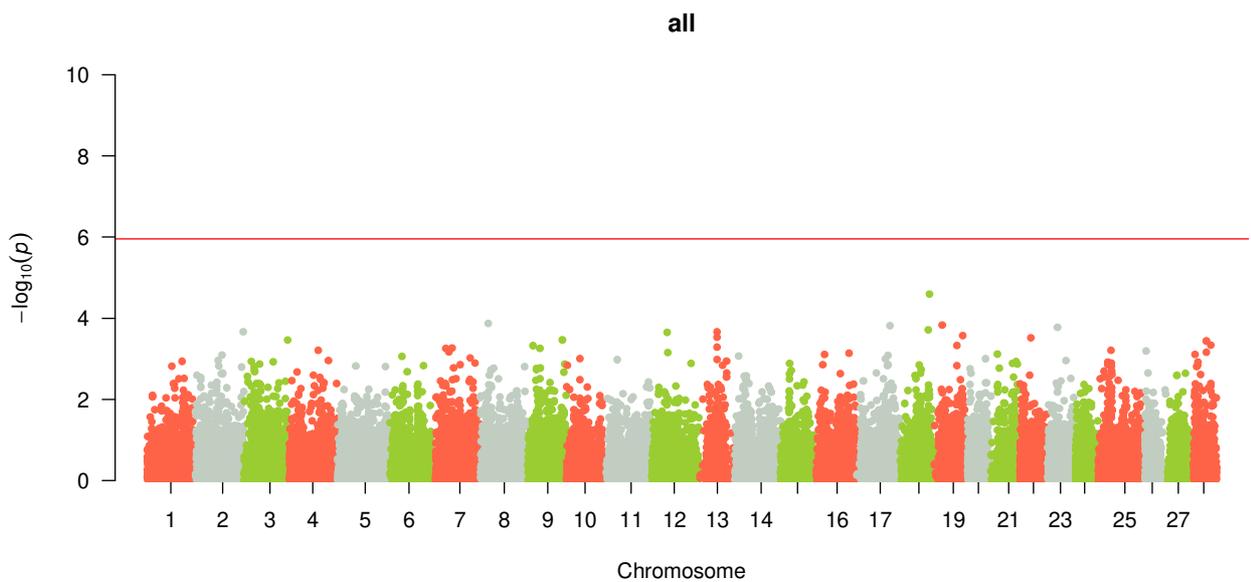


Figura 2: risultati dello studio di associazione genomica

Genetic Approach	Species	Pathogen/Disease	Reference
Marker-assisted Selection	Rainbow trout	<i>Rhabdovirus</i>	[24]
	Rainbow trout	<i>Aeromonas salmonicida</i>	[25]
	Rainbow trout	<i>Vibrio anguillarum</i>	[26]
	Rainbow trout	<i>Flavobacterium psychrophilum</i>	[27]
	Rainbow trout	Viral hemorrhagic septicemia virus	[27]
	Rainbow trout	<i>Flavobacterium columnare</i>	[28]
	Rainbow trout	<i>Flavobacterium psychrophilum</i>	[29]
	Atlantic salmon	Infectious Pancreatic Necrosis Virus	[22,23]
	Atlantic salmon	<i>Caligus rogercresseyi</i>	[31]
	Atlantic salmon	<i>Neoparamoeba perurans</i>	[30]
	Atlantic salmon	<i>Lepeophtheirus salmonis</i>	[32]
	Shrimp	White spot syndrome virus	[33]
	Gene-assisted Selection	Atlantic salmon	Infectious pancreatic necrosis virus
Atlantic salmon		Infectious pancreatic necrosis virus	[35]
Rainbow trout		<i>Lactococcus garvieae</i>	[36]
Rainbow trout		<i>Flavobacterium psychrophilum</i>	[37]
Atlantic salmon		Infectious salmon anaemia	[38]
Atlantic salmon		<i>Aeromonas salmonicida</i>	[39]
Oyster		<i>Perkinsus marinus</i>	[41]
Genomic Selection	Rainbow trout	<i>Flavobacterium psychrophilum</i>	[44]
	Shrimp–Oyster	-	[46]
	Sea bass–Sea bream	-	[47]
	Atlantic salmon	<i>Caligus rogercresseyi</i>	[49]
	Atlantic salmon	-	[48]
	Atlantic salmon	<i>Lepeophtheirus salmonis</i>	[49]
	Atlantic salmon	-	[52]
	Atlantic salmon	<i>Neoparamoeba perurans</i>	[30]
	Catfish	<i>Edwardsiella ictaluri</i>	[50]
	Catfish	<i>Flavobacterium columnare</i>	[51]
	Shrimp	White spot syndrome virus	[52]
Genome Editing	Sea bream	-	[54]
	Catfish	-	[55]

Figura 3: Metodi di selezione applicati a differenti specie e differenti patogeni (tratto da Sciuto et al., 2022)

PUBBLICAZIONI SUPERTROUT

1. **Khalil S.M.I., Bulfon C., Galeotti M., Acutis P.L., Altinok I., Kotzamanidis C., Vela A.I., Fariano L., Prearo M., Colussi S., Volpatti D. (2023).** Immune profiling of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to *Lactococcus garvieae*: evidence in asymptomatic versus symptomatic or vaccinated fish.
Journal of Fish Diseases, 46, 7: 731-741.
DOI: 10.1111/jfd.13782; PMID: 36943008.
2. **Stoppani N., Colussi S., Pastorino P., Prearo M., Sciuto S., Altinok I., Öztürk R.Ç., Ture M., Vela A.I., Blanco M.d.M., Kotzamanidis C., Bitchava K., Malousi A., Fariano L., Volpatti D., Acutis P.L., Fernández-Garayzábal J.F. (2023).** 16S-23S rRNA Internal Transcribed Spacer region (ITS) sequencing: a potential molecular diagnostic tool for differentiating *Lactococcus garvieae* and *Lactococcus petauri*.
Microorganisms, 11 (5): 1320.
DOI: 10.3390/microorganisms11051320; PMID: 37317294; PMCID: PMC10223780.
3. **Khalil S.M.I., Saccà E., Galeotti M., Sciuto S., Stoppani N., Acutis P.L., Öztürk R.C., Bitchava K., Blanco M.d.M., Fariano L., Prearo M., Colussi S., Volpatti D. (2023).** In field study on immune-genes expression during a lactococcosis outbreak in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).
Aquaculture, 574: 739633.
DOI: 10.1016/j.aquaculture.2023.739633.
4. **Vela A.I., Blanco M.d.M., Colussi S., Kotzamanidis C., Prearo M., Altinok I., Acutis P.L., Volpatti D., Alba P., Feltrin F., Ianzano A., Dominguez L., Fernandez-Garayzabal J.F. (2024).** The association of *Lactococcus petauri* with lactococcosis is older than expected.
Aquaculture, 578: 740057.
DOI: 10.1016/j.aquaculture.2023.740057.
5. **Öztürk R.C., Ustaoglu D., Ture M., Bondavalli F., Colussi S., Pastorino P., Vela A.I., Kotzamanidis C., Fernandez-Garayzabal J.F., Bitchava K., Terzi Y., Volpatti D., Altinok I. (2024).** Epidemiological cutoff values and genetic antimicrobial resistance of *Lactococcus garvieae* and *L. petauri*.
Aquaculture, 593: 741340.
DOI: 10.1016/j.aquaculture.2024.741340.
6. **Ustaoglu D., Öztürk R.Ç., Ture M., Colussi S., Pastorino P., Vela A.I., Kotzamanidis C., Volpatti D., Acutis P.L., Altinok I. (2024).** Multiplex PCR assay for the accurate and rapid detection and differentiation of *Lactococcus garvieae* and *L. petauri*.
Journal of Fish Diseases, 00: e14004.
DOI: 10.1111/jfd.14004.