

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN  
SCIENZE VETERINARIE

Ciclo XXIX

**Settore Concorsuale: 07/H3**

**Settore Scientifico Disciplinare: VET/06**

**Vibriosi da *Vibrio harveyi*:  
studi di eziopatogenesi e di efficacia vaccinale nel branzino  
(*Dicentrarchus labrax*)**

**Presentata da: Tobia Pretto**

**Coordinatore Dottorato**

**Prof. Arcangelo Gentile**

**Supervisore**

**Prof.ssa Marialetizia Fioravanti**

**Co-supervisore**

**Dott. Amedeo Manfrin**

**Esame finale anno 2018**

# INDICE

INDICE DELLE TABELLE .....	5
INDICE DELLE TAVOLE .....	6
INDICE DEI GRAFICI .....	6
INDICE DELLE APPENDICI .....	6
ELENCO DELLE ABBREVIAZIONI.....	7
<b>PREMESSA</b> .....	10
<b>1 PARTE GENERALE</b> .....	12
1.1 PATOLOGIE ASSOCIATE AL GENERE <i>VIBRIO</i> IN ACQUACOLTURA.....	12
1.2 <i>VIBRIO HARVEYI</i> .....	12
1.2.1 Specie suscettibili .....	13
1.2.2 Segni clinici nelle specie ittiche .....	17
1.2.3 Segni clinici negli invertebrati.....	17
1.2.4 Segni clinici nel branzino .....	18
1.2.5 Trasmissione e fattori che influenzano l'infezione in <i>V. harveyi</i> .....	18
1.3 CARATTERIZZAZIONE POLIFASICA DI <i>V. HARVEYI</i> .....	19
1.3.1 Crescita in coltura ed identificazione fenotipica .....	19
1.3.2 Identificazione biomolecolare .....	20
1.3.3 Filogenesi.....	21
1.3.4 Proteomica mediante MALDI-TOF .....	21
1.4 VALUTAZIONE DELL'ANTIBIOTICO-RESISTENZA .....	22
1.4.1 Terapia antibiotica nei confronti delle vibriosi.....	24
1.4.2 Studi di antibiotico-resistenza in <i>V. harveyi</i> .....	24
1.5 CENNI DI IMMUNITÀ NEI TELEOSTEI .....	25
1.5.1 Leucociti .....	25
1.5.2 Immunità innata.....	26
1.5.3 Immunità adattativa-specifica.....	27
1.5.3.1 Organi linfoidi.....	27
1.5.3.2 Cellule implicate nell'immunità adattativa.....	28
1.5.3.3 Immunità mucosale.....	29
1.6 VACCINAZIONE .....	30
1.6.1 Finalità e tipologie vaccinali.....	30
1.6.2 Impiego di adiuvanti vaccinali.....	32
1.6.3 Vie di somministrazione.....	33
1.6.4 Efficacia Vaccinale RPS.....	33
1.6.5 Vaccinazione contro <i>V. anguillarum</i> in branzino .....	34
1.6.6 Vaccinazione contro <i>V. harveyi</i> .....	35
1.7 VALUTAZIONE DELLA RISPOSTA IMMUNITARIA UMORALE .....	36
<b>2 MATERIALI E METODI</b> .....	37
2.1 BATTERIOLOGIA .....	37
2.1.1 Collezione di <i>Vibrio</i> spp. ....	37
2.1.1.1 Crescita e stoccaggio a breve e lungo termine.....	39
2.1.2 Identificazione fenotipica di <i>Vibrio harveyi</i> e <i>Vibrio</i> spp. ....	40
2.1.2.1 Terreni selettivi e differenziali.....	40
2.1.2.2 O/129 Vibriostatic test .....	40
2.1.2.3 API20E.....	41
2.1.3 Identificazione biomolecolare .....	41
2.1.3.1 Estrazione del DNA batterico .....	41
2.1.3.2 Amplificazione del gene <i>pyrH</i> .....	42
2.1.3.3 Amplificazione del gene <i>toxR</i> specie-specifico .....	43
2.1.3.4 Analisi filogenetica .....	45
2.1.4 Identificazione proteomica .....	46

2.1.4.1	Preparazione dei campioni batterici.....	46
2.1.4.2	Analisi MALDI-TOF .....	46
2.1.5	Valutazione dell'antibiotico-resistenza .....	47
2.1.5.1	Antibiogrammi mediante diffusione (test Kirby-Bauer).....	47
2.1.5.2	Microdiluzione in brodo (MIC) .....	48
2.2	PROVE DI INFEZIONE IN BRANZINO .....	50
2.2.1	Set-up sperimentale .....	50
2.2.2	Selezione e preparazione ceppi di <i>V. harveyi</i> .....	51
2.2.3	Infezione mediante inoculo IP (Pre-challenge) .....	51
2.2.4	Infezione mediante immersione.....	52
2.2.5	Selezione dei ceppi più virulenti mediante inoculo IP .....	52
2.2.6	Determinazione della DL <sub>70</sub> dei ceppi virulenti .....	53
2.3	PREPARAZIONE VACCINALE .....	54
2.3.1	Vaccino polivalente .....	54
2.3.2	Protocollo vaccinale.....	55
2.3.3	Prove di safety vaccinale .....	55
2.3.4	Prove di efficacia vaccinale .....	56
2.3.5	Valutazione dell'efficacia vaccinale.....	58
2.4	SIERO POLICLONALE PRODOTTO IN CONIGLIO .....	59
2.5	ISTOLOGIA ED IMMUNOISTOCHEMICA .....	59
2.6	SIEROLOGIA .....	60
2.6.1	Standardizzazione di un protocollo ELISA indiretto.....	60
2.6.2	Analisi dei sieri da prove di sicurezza ed efficacia vaccinale .....	61
3	<b>RISULTATI</b> .....	62
3.1	BATTERIOLOGIA .....	62
3.1.1	Identificazione fenotipica di <i>Vibrio harveyi</i> .....	62
3.1.1.1	Crescita in terreni selettivi e differenziali .....	62
3.1.1.2	API20E.....	63
3.1.2	Identificazione biomolecolare .....	65
3.1.2.1	Amplificazione del gene <i>pyrH</i> .....	65
3.1.2.2	Amplificazione del gene <i>toxR</i> specie-specifico .....	66
3.1.2.3	Analisi filogenetica .....	68
3.1.3	Identificazione proteomica .....	69
3.1.4	Valutazione dell'antibiotico-resistenza .....	70
3.1.4.1	Antibiogrammi mediante diffusione (test Kirby-Bauer).....	70
3.1.4.2	Microdiluzione in brodo (MIC) .....	71
3.2	PROVE DI INFEZIONE IN BRANZINO .....	74
3.2.1	Infezione mediante inoculo IP (pre-challenge).....	74
3.2.2	Infezione mediante immersione.....	76
3.2.3	Selezione dei ceppi virulenti ed identificazione della DL <sub>70</sub> .....	76
3.3	PREPARAZIONE VACCINALE.....	78
3.3.1	Prove di sicurezza vaccinale (safety test) .....	78
3.3.2	Prove di efficacia vaccinale (potency test) .....	79
3.3.2.1	Prima prova .....	79
3.3.2.2	Seconda prova .....	81
3.3.3	Valutazione dell'efficacia vaccinale.....	82
3.4	ANALISI ISTOLOGICA ED IMMUNOISTOCHEMICA .....	83
3.5	SIEROLOGIA .....	87
3.6	ISOLAMENTO DI <i>V. HARVEYI</i> DA SPECIE ORNAMENTALI .....	89
4	<b>DISCUSSIONE</b> .....	90
4.1	IDENTIFICAZIONE POLIFASICA DI <i>V. HARVEYI</i> .....	90
4.1.1	Caratteristiche fenotipiche .....	90
4.1.2	Approccio biomolecolare.....	91
4.1.3	Analisi filogenetica del gene <i>pyrH</i> .....	91
4.2	VALUTAZIONE DELL'ANTIBIOTICO-RESISTENZA E MIC .....	92

4.3	PATOGENICITÀ IN BRANZINO .....	93
4.4	LESIONI ANATOMO-ISTOPATOLOGICHE ASSOCIATE ALL'INFEZIONE DA <i>V. HARVEYI</i> .....	95
4.5	EFFICACIA DELLA VACCINAZIONE .....	96
5	<b>CONCLUSIONI</b> .....	98
6	<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	99
	APPENDICE A .....	113
	APPENDICE B .....	114
	APPENDICE C .....	116
	ABSTRACT .....	118

## Indice delle Tabelle

- Tabella 1:** Classificazione tassonomica di *Vibrio harveyi* (Johnson & Shunk, 1936); p. 12
- Tabella 2:** Elenco delle specie suscettibili ad infezione da *V. harveyi*; pp. 14-16
- Tabella 3:** Caratteristiche delle popolazioni cellulari evidenziabili nel circolo ematico in *D. labrax*; p. 26
- Tabella 4:** Elenco dei ceppi inclusi nella collezione; p. 38-39
- Tabella 5:** Condizioni di amplificazione PCR per il gene *pyrH*; p. 42
- Tabella 6:** Profilo termico di amplificazione per il gene *pyrH*; p. 43
- Tabella 7:** Condizioni di amplificazione PCR per il gene *toxR*; p. 44
- Tabella 8:** Profilo termico di amplificazione per il gene *toxR*; p. 44
- Tabella 9:** Elenco delle specie batteriche comparate mediante analisi del gene *pyrH*; p. 45
- Tabella 10:** Categorizzazione dei diametri degli aloni di inibizione degli antibiotici impiegati in Kirby-Bauer; p. 48
- Tabella 11:** Concentrazioni antibiotiche presenti nei pozzetti della micropiastrella impiegata per la determinazione delle MIC; p. 49
- Tabella 12:** Variabilità fenotipica dei ceppi selezionati per le prove di patogenicità in branzino; p. 51
- Tabella 13:** Concentrazioni batteriche impiegate nelle prove di patogenicità per inoculo IP e immersione per i diversi ceppi di *V. harveyi*; p. 53
- Tabella 14:** Schema della prima prova di efficacia vaccinale; p. 57
- Tabella 15:** Schema della seconda prova vaccinale; p. 58
- Tabella 16:** Risultati delle prove biochimiche in micrometodo (API20E) eseguite su *V. harveyi* isolati da specie ittiche e da molluschi bivalvi; p. 64
- Tabella 17:** Valutazione dell'antibiotico-resistenza mediante diffusione in agar (Kirby-Bauer); p. 70
- Tabella 18:** Valutazione della minima concentrazione inibente mediante microdiluzione in brodo; p. 71
- Tabella 19:** Valori di MIC<sub>50</sub> e MIC<sub>90</sub> espressi in µg/ml calcolati per le diverse origini dei ceppi di *V. harveyi*; p. 73
- Tabella 20:** Mortalità causata da diversi ceppi di *V. harveyi* con inoculo IP a differenti concentrazioni; p. 76
- Tabella 21:** Determinazione della DL<sub>70</sub> espressa come ufc/esemplare ed in ufc/g di p.v. dell'esemplare per ciascun ceppo di *V. harveyi*; p. 77
- Tabella 22:** Risultati delle prove di infezione per immersione a differenti concentrazioni; p. 77
- Tabella 23:** Risultati della prima prova di efficacia vaccinale; p. 82
- Tabella 24:** Risultati della seconda prova di efficacia vaccinale; p. 82
- Tabella 25:** Specie ornamentali suscettibili a vibriosi da *V. harveyi*; p. 89

## Indice delle Tavole

- Tavola 1:** Valutazione dell'antibiotico-resistenza mediante diffusione in agar (Kirby-Bauer) e microdiluizione in brodo (MIC); p. 48
- Tavola 2:** Vasche impiegate per la stabulazione e le prove di infezione e vaccinazione presso l'acquario sperimentale IZSVE; p. 50
- Tavola 3:** Terreni selettivi e differenziali; p. 63
- Tavola 4:** Lettura delle gallerie miniaturizzate API20E; p. 65
- Tavola 5:** Gel elettroforetici degli amplificati del gene *toxR* e del gene *pyrH*; p. 67
- Tavola 6:** Albero filogenetico ottenuto dall'analisi Neighbour-Joining delle sequenze del gene *pyrH*; p. 68
- Tavola 7:** Lesioni anatomo-patologiche conseguenti ad infezione da *V. harveyi*, in prove di patogenicità ed efficacia vaccinale; p. 75
- Tavola 8:** *Safety test* condotto per il vaccino adiuvato somministrato IP a dose doppia (0,2 ml); p. 78
- Tavola 9:** Quadri istopatologici di branchia, cuore, encefalo, intestino prossimale prelevati da esemplari infettati via IP con *V. harveyi* e comparati con tessuti normotipici di branzino; p. 84
- Tavola 10:** Quadri istopatologici di pancreas, fegato, milza prelevati da esemplari infettati via IP con *V. harveyi* e comparati con tessuti normotipici di branzino; p. 85
- Tavola 11:** Quadri istopatologici di rene cefalico, rene del tronco, cute e tessuto muscolare prelevati da esemplari infettati via IP e per immersione con *V. harveyi*; p. 86
- Tavola 12:** Specificità del siero policlonale applicato in IHC; p. 87
- Tavola 13:** Micropiastre per valutazione in ELISA indiretta del siero; p. 88

## Indice dei Grafici

- Grafico 1:** Distribuzione percentuale dei ceppi secondo i valori di MIC identificati per ciascuna molecola antibiotica, distinti in base all'origine dell'isolamento (allevati, ornamentali ed ambientali); pp. 72-73
- Grafico 2:** Andamento della mortalità in esemplari vaccinati con inoculo non adiuvato ed infettati IP con 3 diversi ceppi di *V. harveyi* (1-21 giorni); p. 79
- Grafico 3:** Andamento della mortalità in esemplari vaccinati con inoculo adiuvato ed infettati IP con 3 differenti ceppi di *V. harveyi* (1-21 giorni); p. 79
- Grafico 4:** Andamento della mortalità in esemplari vaccinati per immersione ed infettati IP con 3 differenti ceppi di *V. harveyi* (1-21 giorni); p. 80
- Grafico 5:** Andamento della mortalità in esemplari vaccinati per immersione ed infettati per immersione con *V. harveyi* Cp. VIII (1-21 giorni); p. 80
- Grafico 6:** Andamento della mortalità in esemplari vaccinati con inoculo non adiuvato ed infettati IP con 3 differenti ceppi di *V. harveyi* (0-21 giorni); p. 81
- Grafico 7:** Risultati dell'analisi ELISA indiretta dei sieri prelevati durante il *safety* e primo *potency test* vaccinale.

## Indice delle Appendici

- Appendice A:** Caratteristiche fenotipiche dei ceppi di *V. harveyi* disponibili in letteratura; p. 113
- Appendice B:** Risultati delle caratteristiche fenotipiche dei ceppi di *V. harveyi* ed altre Vibrionaceae analizzati in questo studio; pp. 114-115
- Appendice C:** Risultati dell'identificazione molecolare (*pyrH* e *toxR*) e assegnazione MALDI-TOF dei ceppi di *V. harveyi* ed altre Vibrionaceae analizzati in questo studio; pp. 116-117

## Elenco delle abbreviazioni

<b>°C</b>	Gradi centigradi
<b>ADH</b>	Arginina deidrolasi
<b>ADJ</b>	Adjuvante
<b>AFLP</b>	Amplified Fragment Length Polymorphism
<b>AS</b>	Agar sangue
<b>ATCC®</b>	American Type Culture Collection
<b>BCCM/LMG</b>	Belgian Co-ordinated Collection of Micro organism/Laboratory of Microbiology
<b>BLAST</b>	Basic Local Alignment Search Tool
<b>bp</b>	base pairs – paia basi
<b>CAMHB</b>	Cation Adjusted Mueller Hinton Broth
<b>CECT</b>	Collección Española de Cultivos Tipo (Universitat de Valencia)
<b>CLSI</b>	Clinical and Laboratory Standards Institute
<b>Cp.</b>	Ceppo batterico
<b>CPA</b>	Cellule Presentanti l' Antigene
<b>d</b>	Days - giorni
<b>DL</b>	Dose Letale
<b>DNA</b>	Deoxyribonucleic Acid
<b>DO</b>	Densità ottica
<b>dph</b>	Days post hatch - giorni dopo la schiusa
<b>DSMZ</b>	Deutsch Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH – Leibniz Institut
<b>E/E</b>	Colorazione Ematossilina/Eosina
<b>ECP</b>	ExtraCellular Products
<b>ELISA</b>	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
<b>ESI</b>	Electron Spray Ionization
<b>EUCAST</b>	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
<b>EURL</b>	European Reference Laboratory
<b>g</b>	Grammo
<b>GALT</b>	Gut-Associated Lymphoid Tissue
<b>h</b>	Ora
<b>IHC</b>	Immunohistochemistry - Immunoistochimica
<b>IP</b>	Intraperitoneale
<b>Kd</b>	Kilo dalton
<b>l</b>	Litro
<b>LDC</b>	Lisina decarbossilasi
<b>LPS</b>	Lipopolisaccaride
<b>m/z</b>	Massa/carica dello ione
<b>MALDI-TOF</b>	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization
<b>MALT</b>	Mucosa-Associated Lymphoid Tissue
<b>mg</b>	Milligrammi
<b>MH</b>	Mueller Hinton agar
<b>MHC</b>	Major Histocompatibility Complex
<b>MIC</b>	Minimal Inhibitory Concentration
<b>min</b>	Minuti
<b>ml</b>	Millilitri
<b>MLSA</b>	Multi Locus Sequence Analysis
<b>mm</b>	Millimetri
<b>MS</b>	Mass Spectrometry
<b>MS-222</b>	Tricaina metansolfonato
<b>NaCl</b>	Cloruro di sodio
<b>nm</b>	Nanometri
<b>O/129</b>	2, 4- diamino-6, 7-di-iso-propylpteridine phosphate
<b>ODC</b>	Ornitina decarbossilasi
<b>p.</b>	Pagina
<b>p.i.</b>	Post infezione
<b>p.v.</b>	Peso vivo
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction
<b>pmf</b>	Peptide mass fingerprint

<b><i>pyrH</i></b>	Gene codificante per Uridina monofosfato chinasi
<b>rpm</b>	Rotazioni per minuto
<b>RPS</b>	Relative Percent Survival – percentuale relativa di sopravvivenza
<b>sec</b>	Secondi
<b>SF</b>	Soluzione fisiologica (0,9%NaCl)
<b>TAE</b>	Tris-Acetato-EDTA
<b>TCBS</b>	Thiosulfate-Citrate-Bile salt-Sucrose agar
<b>TCR</b>	T Cell Receptor
<b>TOF</b>	Time of Flight – Tempo di volo
<b>TSA</b>	Tryptone Soya Agar
<b>TSB</b>	Tryptone Soya Broth
<b>ufc</b>	Unità formanti colonie
<b>UV</b>	Ultravioletto
<b>VP</b>	Test di Voges-Proskauer
<b>μL</b>	Microlitri



Vita brevis, ars longa, occasio praeceps,  
experimentum periculosum, iudicium difficile.

## PREMESSA

*Vibrio harveyi* è un batterio Gram negativo della famiglia *Vibrionaceae* che rappresenta un patogeno emergente per l'acquacoltura marina a livello globale. Segnalato con sempre maggior frequenza in specie ittiche allevate nelle regioni subtropicali (cernie, barramundi, pesci piatti, carangidi), in elasmobranchi ed in gasteropodi (abalone), è storicamente un problema nell'allevamento delle fasi larvali dei gamberi peneidi. In ambito europeo e mediterraneo questo microrganismo sta acquisendo importanza nell'allevamento del branzino (*Dicentrarchus labrax*) e dei pesci piatti (*Solea* spp.).

In *D. labrax*, *V. harveyi* è stato isolato in corso di episodi di mortalità caratterizzati da atassia natatoria, lesioni cutanee ed enteriche prevalentemente durante le fasi di ingrasso (40-160 g) e secondariamente in giovanili stabulati in avannotteria. A differenza del più noto patogeno *Vibrio anguillarum*, sono ancora sporadici gli studi sull'eziopatogenesi di *V. harveyi* nel branzino e la caratterizzazione dei ceppi isolati da questa specie. Inoltre gli studi di efficacia vaccinale contro *V. harveyi* sono limitati ad alcune specie subtropicali e risultano mancanti in branzino. Al contempo dall'analisi della bibliografia non sono disponibili report sul trattamento farmacologico dell'infezione da *V. harveyi* e non è stato indagato in questa specie lo sviluppo di antibiotico-resistenza.

Un obiettivo iniziale di questo studio è stato perciò lo sviluppo di un protocollo di identificazione per *V. harveyi* mediante un approccio polifasico basato su analisi fenotipiche, genetiche e del profilo proteico. La capacità discriminante dei differenti metodi è stata valutata comparando 89 isolati di campo di *V. harveyi* (ceppi isolati in specie ittiche e bivalvi), di cui 50 identificati in episodi clinici in branzino, con ceppi di referenza di *V. harveyi* e di altre specie della famiglia *Vibrionaceae* selezionate tra quelle filogeneticamente associate al clade *Harveyi* (*V. owensii*, *V. campbellii*, *V. alginolyticus*, *V. natriegens*, *V. rotiferianus*, *V. parahaemolyticus*, *V. mytili*) o causa di patologia in branzino o con caratteristiche fenotipiche simili. Si è cercato in particolare di verificare la specificità dell'analisi MALDI-TOF applicata al clade *Harveyi* ed è stata perfezionata una PCR end-point specie-specifica per garantire una rapida identificazione degli isolati.

Per sopperire alla mancanza di dati bibliografici sull'antibiotico-resistenza di questa specie nell'area mediterranea è stato valutato il profilo di sensibilità ai principali antibiotici impiegati in acquacoltura su 51 ceppi di *V. harveyi*, isolati da episodi clinici o da campioni ambientali, mediante antibiogramma condotto secondo il metodo di diffusione in agar (test Kirby-Bauer) e la microdiluzione in brodo per la determinazione della concentrazione minima inibente.

Il secondo obiettivo dello studio è stato lo sviluppo di un protocollo sperimentale di vaccinazione protettiva dall'infezione da *V. harveyi*. Inizialmente si è voluto indagare la patogenicità di 10 differenti isolati di *V. harveyi* in branzino, con prove di infezione mediante inoculo ed immersione, valutando l'andamento della mortalità, la sintomatologia associata, e determinando per i ceppi maggiormente patogeni la Dose Letale ( $DL_{70}$ ). Successivamente è stato sviluppato a partire dai tre

ceppi più patogeni un vaccino per immersione e per inoculo intraperitoneale basato su bacterin addizionato o meno con adiuvante. Dopo una valutazione della sicurezza delle preparazioni vaccinali sono state condotte delle prove di efficacia vaccinale mediante infezione con ceppi omologhi ed eterologhi a quelli contenuti nel vaccino polivalente. L'efficacia vaccinale è stata determinata mediante calcolo della percentuale relativa di sopravvivenza e valutazione della risposta anticorpale elicitata dai differenti protocolli vaccinali mediante ELISA indiretta.

## 1 PARTE GENERALE

### 1.1 Patologie associate al genere *Vibrio* in acquacoltura

Nell'ambito dell'acquacoltura globale, sviluppata in acque salmastre e marine, alcune specie appartenenti al genere *Vibrio* sono tra i patogeni in grado di determinare le maggiori perdite produttive sia nell'allevamento ittico che nella molluschicoltura e crostaceicoltura (Haenen et al., 2014). Le specie del genere *Vibrio* sono ubiquitarie negli ecosistemi acquatici, riscontrandosi prevalentemente in ambiente marino come parte della normale microflora degli organismi acquatici o come loro patogeni, sebbene siano in grado di persistere per lungo tempo nell'acqua marina e nei sedimenti (Marco-Noales et al., 1999). Alcune specie, tra cui *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, sono causa di patologia nell'uomo, in genere veicolate da acqua o alimento (bivalvi consumati crudi) (Austin, 2010). I *Vibrio* sono organismi Gram negativi appartenenti alla classe Gammaproteobacteria, appaiono come corti bacilli ricurvi, mobili per flagelli polari, anaerobi facoltativi e fermentati (Buller, 2014). In ambito europeo *V. anguillarum* sierotipo O1, *V. ordalii* e *V. vulnificus* sono tra le specie maggiormente responsabili di mortalità nell'allevamento di specie ittiche d'acqua temperata (branzino, orata, ombrina boccadoro, anguilla), mentre *V. anguillarum* (sierotipo O1, O2a, O2b) e *Aliivibrio salmonicida* sono implicati in mortalità nelle specie d'acqua fredda (salmonidi, merluzzo, labridi e lompo) (Haenen et al., 2014). Altre specie patogene meno frequentemente segnalate sono *V. alginolyticus*, *V. tapetis*, *V. splendidus* e *V. pelagius*. I fattori predisponenti l'insorgenza di queste patologie sono legati a rapidi incrementi di temperatura (>17-19°C nelle specie d'acqua calda, >14°C per specie d'acqua fredda) e stress meccanici connessi a manipolazione, selezione e trasporto. Lo sviluppo di vaccini (specifici per sierotipo) a partire dai primi anni '80, ha mitigato l'impatto di questi patogeni riducendo l'impiego estensivo di trattamenti antibiotici. La specie *V. harveyi* segnalata sporadicamente a partire dagli anni '90 come vibriosi atipica sta acquisendo rilevanza nel bacino del Mediterraneo prevalentemente nell'allevamento del branzino. Tuttavia per questo microorganismo, a differenza delle specie precedentemente citate, non sono registrati preparati vaccinali e le informazioni relative all'infezione sono ancora incomplete.

### 1.2 *Vibrio harveyi*

Dominio	Prokaryota
Regno	Bacteria
Phylum	Proteobacteria
Classe	Gammaproteobacteria
Ordine	Vibrionales
Famiglia	Vibrionaceae
Genere	<i>Vibrio</i>
Specie	<i>V. harveyi</i>

**Tabella 1:** Classificazione tassonomica di *Vibrio harveyi* (Johnson & Shunk, 1936)

Il microrganismo attualmente classificato come *Vibrio harveyi* (ATCC 14126) è stato isolato originariamente da un anfipode del genere *Talorchestia* presso Woods Hole, Massachusetts, USA nel 1935 e denominato *Achromobacter harveyi* in onore di E. N. Harvey, un pioniere dello studio della bioluminescenza (Johnson and Shunk, 1936). Più tardivamente assegnato al genere *Lucibacterium* e poi al genere *Beneckeia*; in seguito all'abolizione del genere *Beneckeia*, la specie è stata infine compresa nel genere *Vibrio* (Baumann et al., 1980). Un microrganismo apparentemente nuovo classificato come *Vibrio carchariae*, isolato da rene di squalo grigio (*Carcharhinus plumbeus*) presso il National Aquarium di Baltimora, USA (Grimes et al., 1984), è stato riconosciuto grazie a studi fenotipici e genetici come sinonimo di *V. harveyi* in quanto indistinguibile da quest'ultimo mediante prove di AFLP-PCR, ibridazione DNA-DNA, ribotipizzazione (Pedersen et al., 1998) e comparazione delle sequenze del 16S DNA ribosomiale (Gauger & Gómez-Chiarri, 2002). Un batterio denominato *Vibrio trachuri* isolato da sgombro giapponese (*Trachurus japonicus*) (Iwamoto et al., 1995) è stato allo stesso modo riconosciuto sinonimo di *V. harveyi* (Thompson et al., 2002). In entrambi i casi *V. harveyi* ha avuto la precedenza in quanto sinonimo *senior*.

*V. harveyi* è stato riscontrato in un ampio range di ambienti acquatici marini temperati (Mediterraneo, Mare del Nord) e tropicali (Oceano Indiano, Oceano Atlantico, Oceano Pacifico) ad una profondità compresa tra 0 e 200 metri (Yetinson and Shilo, 1979). È implicato nel fenomeno del *milky sea*, luminescenza diffusa della superficie marina prodotta dall'associazione con fioriture algali del genere *Phaeocystis* (Miller et al., 2005). *V. harveyi* può presentare vita libera in acqua marina o nei sedimenti, far parte nella microflora enterica in specie ittiche (Makemson and Hermosa Jr, 1999; Ramesh and Venugopalan, 1989) ed è inoltre segnalato come patogeno primario in numerose specie di pesci ossei e cartilaginei e di invertebrati quali gamberi peneidi, gasteropodi ed echinodermi.

### 1.2.1 Specie suscettibili

In Tabella 2 sono riportate le specie in cui *V. harveyi* è stato descritto in infezione naturale e alcune specie suscettibili ad infezione sperimentale. Complessivamente le segnalazioni di infezioni da *V. harveyi* appaiono piuttosto localizzate alle regioni tropicali e moderatamente a quelle temperate (Mediterraneo, Mare del Nord). *V. harveyi* è stato isolato anche nell'uomo a seguito di infezione di lesioni traumatiche da morso di squalo (Pavia et al., 1989) o per contaminazione di ferite esposte all'acqua marina (Del Gigia-Aguirre et al., 2017).

SPECIE	SEGNI CLINICI	RIFERIMENTO BIBLIOGRAFICO	LOCALITÀ	NOTE
<i>Acanthopagrus latus</i>	Gastroenterite sierosa	(Lee et al., 2002)	Taiwan	
<i>Acanthopagrus schlegeli</i>	Gastroenterite sierosa	(Lee et al., 2002)	Taiwan	
<i>Acanthurus sohal</i>	Ulcere emorragiche, erosione delle pinne, anoressia, letargia	(Hashem & El-Barbary, 2013)	Acquario pubblico, Egitto	
<i>Caranx hippos</i>	Lesioni profonde del derma	(Austin & Zhang, 2006)	USA	
<i>Carcharhinus plumbeus</i>	Vasculite	(Grimes et al., 1984)	Acquario pubblico	
<i>Carcharhinus plumbeus</i>	Ulcere cutanee croniche	(Bertone et al., 1996)		
<i>Centropomus undecimalis</i>	Cheratite con opacità corneale	(Kraxberger-Beatty et al., 1990)	USA	infezione opportunistica post manipolazione
<i>Chaetodipterus faber</i>	Esoftalmo bilaterale, cheratite, ifema ed emorragie delle pinne	(Alvarez et al., 1998)	Venezuela	
<i>Chanos chanos</i>	Oftalmite	(Ishimaru & Muroga, 1997)	Filippine	
<i>Cleidopus gloriamaris</i>	Emorragie opercolari e perioculari/ulcere assenti	(Won et al., 2009)	Acquario pubblico Corea del Sud	
<i>Dentex dentex</i>	Mortalità	(Company et al., 1999)	Spagna	
<i>Dentex dentex</i>	Ulcere cutanee	(Jun et al., 2014)	Creta	
<i>Dicentrarchus labrax</i>	Mortalità	(Pujalte et al., 2003)	Spagna	
<i>Dicentrarchus labrax</i>	Esoftalmo, melanosi, perdita delle scaglie, ulcere cutanee, emorragie di pinne e regione orale, anemia branchiale	(Korun, 2008)	Turchia	
<i>Dicentrarchus labrax</i>	Anoressia, letargia, atassia natatoria. Erosioni cutanee e delle pinne, cheratite monolaterale, splenomegalia e congestione cerebrale	(Florio et al., 2012)	Italia	Mortalità a stillicidio
<i>Dicologlossa cuneata</i>		(López et al., 2009)	Spagna	
<i>Epinephelus awoara</i>	Mortalità acuta	(Qin et al., 2006)	Cina	
<i>Epinephelus bruneus</i>	Mortalità	(Harikrishnan et al., 2012)	Corea del Sud	Infezione sperimentale
<i>Epinephelus coioides</i>	Gastroenterite sierosa, setticemia	(Yii et al., 1997)	Taiwan	
<i>Epinephelus coioides</i>	Enterite sierosa	(Yii et al., 1997) (Nguyen et al., 2017)	Taiwan	Infezione naturale e sperimentale
<i>Epinephelus fuscoguttatus</i> (♀) × <i>E.lanceolatus</i> (♂)	Ulcere cutanee e buccali, emorragie cutanee, perdita delle scaglie, enterite, splenomegalia ed elevata mortalità	(Shen et al., 2017)	Taiwan	Infezione naturale e sperimentale (4-6 g)
<i>Epinephelus tauvina</i>	Mortalità	(Saeed, 1995)	Kuwait	Infezione naturale e sperimentale
<i>Hippocampus kuda</i>	Erosione coda, aree cutanee biancastre e rossastre, anoressia, dispnea	(Raj et al., 2010)	Acquario pubblico, India	Infezione naturale e sperimentale
<i>Hippocampus kuda</i> , <i>Hippocampus spp.</i>	Emorragie cutanee ed epatiche ed ascite	(Alcaide et al., 2001)	Acquario pubblico, Spagna	
<i>Lateolabrax japonicus</i>	Gastroenterite sierosa	(Lee et al., 2002)	Taiwan	
<i>Lateolabrax maculatus</i>	Mortalità	(Han et al., 2017)	Cina	Infezione sperimentale
<i>Lates calcarifer</i>	Lesioni cutanee, emorragia delle pinne, erosione pinne, esoftalmo	(Tendencia, 2002)	Filippine	
<i>Lates calcarifer</i>	Melanosi, anoressia, ulcere emorragiche cutanee, orali ed erosione pinne, opacità corneale, necrosi focale della muscolatura e enterite sierosa	(Ransangan et al., 2012)	Malesia	Infezione naturale e sperimentale
<i>Lates calcarifer</i>	Perdita delle scaglie, necrosi muscolare, emorragie encefaliche	(Dong et al., 2017)	Vietnam	
<i>Mola mola</i>	Infezione opportunistica oculare, secondaria a traumatismo	(Hispano et al., 1997)	Acquario pubblico, Spagna	

SPECIE	SEGNI CLINICI	RIFERIMENTO BIBLIOGRAFICO	LOCALITÀ	NOTE
<i>Mugil curema</i>	Setticemia emorragica	(Alvarez et al., 1998)	Venezuela	
<i>Negaprion brevirostris</i>	Vasculite, anoressia, disorientamento, cisti necrotiche subdermiche	(Grimes et al., 1985)	Acquario pubblico	
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Gastroenterite, emorragie celomatiche e perianali, congestione epatica	(Zhang & Austin, 2000)	Acquario sperimentale	Infezione sperimentale
<i>Pagrus auratus</i>	Anemia, enterite sierosa, timpanismo della vescica natatoria	(Stephens et al., 2006)	Australia	Coinfezione con <i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i>
<i>Paralichthys dentatus</i>	Enterite necrotizzante (intestino terminale), ascite emorragica, arrossamento anale	(Soffientino et al., 1999)	USA Rhode Island	
<i>Paralichthys olivaceus</i>	Ascite	(Oh et al., 2006)	Corea del Sud	Mortalità associata a Birnavirus e <i>Edwardsiella tarda</i>
<i>Pseudosciaena crocea</i>	Mortalità	(Liu et al., 2016)	Cina	
<i>Rachycentron canadum</i>	Gastroenterite sierosa	(Liu et al., 2004)	Taiwan	
<i>Salmo salar</i>	Gastroenterite, emorragie celomatiche e perianali, congestione epatica	(Zhang & Austin, 2000)	Acquario sperimentale	
<i>Sciaenops ocellatus</i>	Gastroenterite sierosa, contenuto giallastro	(Liu et al., 2003)	Taiwan	
<i>Scophthalmus maximus</i>	Melanosi emorragie	(Sun et al., 2007)		
<i>Seriola dumerili</i>	Ulcere cutanee ed erosioni del capo, erosione delle pinne, ascite, oftalmite	(Minami et al., 2016)	Giappone	
<i>Seriola dumerili</i>	Ulcere cutanee, soffusioni emorragiche, erosione delle pinne	(Jun et al., 2014)	Creta	
<i>Solea senegalensis</i>	Ulcere cutanee ed emorragie di regione periorale e pinne	(Zorrilla et al., 2003)	Spagna	
<i>Sparidentex hasta</i> – <i>Acanthopagrus cuvieri</i>	Mortalità	(Saeed, 1995)	Kuwait	Infezione sperimentale
<i>Sparus aurata</i>	Erosione della pinna caudale, ipermucosità cutanea, emorragie in camera branchiale, oftalmite	(Haldar et al., 2010)	Malta	Infezione naturale ed infezione sperimentale
<i>Sparus aurata</i>	Mortalità	(Pujalte et al., 2003); (Balebona et al., 1998)	Spagna	Co-infezione con altri microrganismi
<i>Takifugu obscurus</i>	Ulcera cutanea ed emorragie alla base delle pinne	(Won et al., 2009)	Acquario pubblico, Corea del Sud	
<i>Takifugu rubripes</i>	Piogranulomatosi in fegato, rene, milza e cuore	(Mohi et al., 2010)	Giappone	Infezione naturale e sperimentale
<i>Trachinotus blochii</i>	Esoftalmo, emorragie oculari	(Pakingking et al., 2018)	Filippine	Infezione naturale e sperimentale
<i>Trachinotus carolinus</i>	Setticemia emorragica	(Alvarez et al., 1998)	Venezuela	
<i>Trachinotus falcatus</i>	Setticemia emorragica	(Alvarez et al., 1998)	Venezuela	
<i>Trachinotus ovatus</i>	Erosioni cutanee	(Tu et al., 2017)	Cina	Infezione naturale e sperimentale
<i>Trachurus japonicus</i>	Esoftalmo, emorragie interne, melanosi, nuoto erratico	(Iwamoto et al., 1995)	Giappone	
<b>VIBRIO HARVEYI IN CROSTACEI</b>				
<i>Jasus verreauxi</i>	“Luminous vibriosis” opacità e macchie rossastre nelle post-larve, necrosi dell’epatopancreas	(Diggles et al., 2000)	Nuova Zelanda	
<i>Litopenaeus stylirostris</i>	Mortalità	(Alvarez et al., 1998)	Venezuela	
<i>Litopenaeus vannamei</i>	“Bolitas negricans”, anoressia, elevata mortalità	(Robertson et al., 1998)	Ecuador	
<i>Litopenaeus vannamei</i>	“Bright Red Syndrome” discolorazione rossastre cuticolari, opacità della muscolatura del pleon, anoressia, letargia	(Soto-Rodriguez et al., 2010)	Messico	Infezione naturale e sperimentale
<i>Marsupenaeus japonicus</i>	Mortalità elevata	(Liu et al., 1996)	Taiwan	

SPECIE	SEGNI CLINICI	RIFERIMENTO BIBLIOGRAFICO	LOCALITÀ	NOTE
<i>Penaeus monodon</i>	“Tea Brown Gill Syndrome”	(Pasharawipas et al., 1998)		
<i>Penaeus monodon</i>	“Luminous vibriosis” nelle post-larve	(Musa et al., 2008)	Malesia	
<i>Penaeus monodon</i>	“Luminous vibriosis” nelle post-larve	(Pizzutto & Hirst, 1995)	Australia	
<i>Penaeus monodon</i>	Mortalità	(Pena et al., 2001)	Filippine	Infezione naturale e sperimentale
<i>Penaeus schmitti</i>	Mortalità	(Alvarez et al., 1998)	Venezuela	
<i>Penaeus semisulcatus</i>	Necrosi dell’epatopancreas	(Mohajeri et al., 2011)	Iran	Infezione sperimentale
<b>VIBRIO HARVEYI IN MOLLUSCHI</b>				
<i>Haliotis discus hannai</i> ( <i>Sulculus diversicolor supratexta</i> )	Perdita adesione del piede, necrosi muscolare associata a macchie biancastre 1-3 mm (ridotta mortalità - 15%)	(Nishimori et al., 1998)	Giappone	
<i>Haliotis laevigata</i>		(Wang et al., 2017)	Australia	isolamento
<i>Haliotis tuberculata</i>	Macchie biancastre sul piede muscolare non sempre presenti (elevata mortalità >85%)	(Nicolas et al., 2002)	1997 Bretagna – 1999 Normandia	
<i>Pinctada maxima</i>		(Pass et al., 1987)	Australia	isolamento
<b>VIBRIO HARVEYI IN ECHINODERMI E CNIDARI</b>				
<i>Acanthaster planci</i>		(Rivera-Posada et al., 2011)	Australia	isolamento
<i>Holothuria scabra</i>	Ulcere cutanee, mortalità	(Becker et al., 2004)	Madagascar	
<i>Sclerattinie</i> (generi <i>Acropora</i> , <i>Seriatopora</i> , <i>Montipora</i> , <i>Pocillopora</i> )	Sbiancamento dei coralli, perdita tissutale con esposizione dell’esoscheletro	(Luna et al., 2009)	Acquario pubblico	
<i>Tripneustes gratilla</i>	Lesioni cutanee	(Becker et al., 2009)	Madagascar	
<b>VIBRIO HARVEYI NELL’UOMO</b>				
<i>Homo sapiens</i>	Morso di squalo, ferita traumatica infetta	(Pavia et al., 1989)	USA	
<i>Homo sapiens</i>	Ferita da lacerazione esposta ad acqua marina	(Del Gigia-Aguirre et al., 2017)	Repubblica Dominicana	
<i>Homo sapiens</i>	Batteriemia da contaminazione catetere con acqua marina in paziente oncologico	(Wilkins et al., 2008)	Francia	

**Tabella 2:** Elenco delle specie suscettibili ad infezione da *V. harveyi*. Distinzione tra le segnalazioni in specie ittiche, crostacei, molluschi, echinodermi e uomo.



### 1.2.2 Segni clinici nelle specie ittiche

*Vibrio harveyi* causa nella maggior parte dei pesci ossei infezioni con localizzazione cutanea o gastroenterica che frequentemente esitano in setticemia (Austin & Zhang, 2006). Le lesioni cutanee possono manifestarsi come erosioni o ulcerazioni, vesciche necrotiche nel derma, forme piogranulomatose (Mohi et al., 2010) e soffusioni emorragiche alla base delle pinne. Lesioni oculari come cheratiti, opacità corneali e panoftalmi sono descritte a seguito di lesioni traumatiche con irruzione secondaria di *V. harveyi* come patogeno opportunista (Pakingking et al., 2018; Minami et al., 2016). I segni gastrointestinali si manifestano generalmente come enterite sierosa con dilatazione del lume intestinale per accumulo di essudato giallastro (Lee et al., 2002; Yii et al., 1997). Sono descritte forme emorragico-necrotiche a carico del tratto terminale dell'intestino (Soffientino et al., 1999). Negli squali *V. harveyi* è stato isolato da ulcere cutanee e da forme setticemiche caratterizzate da vasculite (Grimes et al., 1984; Grimes et al., 1985).

### 1.2.3 Segni clinici negli invertebrati

Nei gamberi peneidi, *Penaeus monodon* e *Litopenaeus vannamei* in special modo, *V. harveyi* determina elevate mortalità nelle fasi larvali con la cosiddetta "Luminous vibriosis" facilmente diagnosticabile per la caratteristica luminescenza delle post-larve e dei giovanili infetti (Pizzutto & Hirst, 1995) e può causare una forma enterica detta "Bolitas nigricans" inducendo apoptosi e sfaldamento dell'epitelio ghiandolare dell'epatopaneas, che si compatta a formare sferule melanizzate che bloccano il tratto intestinale delle post-larve (Robertson et al., 1998). *V. harveyi* è inoltre segnalato nella "Bright red syndrome" in *L. vannamei* causando discolorazioni rossastre cuticolari, necrosi muscolari e dell'organo linfoide (Soto-Rodriguez et al., 2010). *V. harveyi* è stato descritto in diverse specie di abalone (*Haliotis tuberculata*, *Haliotis discus hannai*) come causa primaria di mortalità (15% - 80%) manifestando lesioni biancastre sul piede muscolare con perdita di adesione del gasteropode alle superfici. Il batterio appare implicato nella "White Syndrome" delle Sclerattinie (generi *Acropora*, *Montipora*, *Pocillopora*, *Seriatopora*) caratterizzata dalla rapida formazione sulle colonie di striature e macchie biancastre di tessuto necrotico con perdita locale dei polipi corallini ed esposizione dell'esoscheletro (Luna et al., 2009). Negli echinodermi come oloturie e ricci di mare tropicali *V. harveyi* è stato isolato da ulcere del tegumento (Becker et al., 2004).

#### 1.2.4 Segni clinici nel branzino

Episodi di mortalità associata a *V. harveyi* in branzino sono stati segnalati in Spagna a partire dal 1999 (Pujalte et al., 2003), dal 2003 in Turchia (Korun, 2008) e dal 2011 in Italia (Florio et al., 2012). La problematica è riscontrata anche in allevamenti ed avannotterie in Francia e Grecia sebbene non siano disponibili dati pubblicati. Le prime evidenze di circolazione di ceppi riferibili a *V. harveyi/V. carchariae* in branzino ed orata nel bacino del Mediterraneo (Grecia, Italia, Spagna e Francia) sono tuttavia retrodatabili a partire dal 1990 (Pedersen et al., 1998). Gli episodi segnalati in Italia (Florio et al., 2012) sono stati osservati per la prima volta in esemplari di peso compreso tra 155 e 230 g, allevati in un impianto intensivo a terra, caratterizzati da anoressia, dimagrimento ed atassia natatoria, con mortalità a stillo protrattasi da maggio ad ottobre. Un altro caso è stato osservato nel periodo invernale (dicembre 2011) in esemplari di 85 g allevati a terra. In entrambi gli episodi l'esame autoptico ha evidenziato accentuato dimagrimento, lesioni erosive a livello di cute e pinne, cheratite monolaterale, splenomegalia e congestione cerebrale di lieve o moderata entità. L'esame istologico ha rilevato un quadro setticemico caratterizzato da focolai necrotici con aggregati batterici osservabili in fegato, milza, cuore ed encefalo; glomerulonefrosi ed iperemia interstiziale, congestione meningea e dei plessi corioidei e grave malattia branchiale con teleangiectasie ed edema, in presenza di colonie batteriche ed ectoparassiti. L'episodio riportato in Turchia ha colpito esemplari giovanili (2-5 g) allevati in gabbia a mare (maggio 2003) a temperatura di 22°C, determinando una mortalità stimata del 9-12% (Korun, 2008). I segni osservati appaiono simili a quanto descritto per soggetti di taglia maggiore: anoressia, nuoto erratico, esoftalmo, melanosi, perdita delle scaglie, ulcere cutanee, emorragie di pinne e regione orale, anemia branchiale. Il quadro istologico rileva prevalentemente fenomeni necrotici a carico dei tubuli renali e del tessuto interstiziale renale, necrosi branchiale, necrosi e sfaldamento dell'epitelio intestinale.

#### 1.2.5 Trasmissione e fattori che influenzano l'infezione in *V. harveyi*

Non sono presenti in letteratura studi specifici sulle vie di trasmissione naturale in *V. harveyi* nelle specie ittiche. È tuttavia ragionevole ipotizzare che possano valere per *V. harveyi* le osservazioni effettuate per il congenero *V. anguillarum*: presenza diffusa del microrganismo nell'ambiente marino; vie di ingresso costituite da lesioni cutanee e delle mucose; sviluppo della patologia condizionato dalla presenza di fattori di rischio ambientali quali: temperature elevate (> 18°C), scarsa qualità dell'acqua (elevata carica organica, bassa concentrazione di ossigeno, inquinamento), elevata densità di allevamento, compresenza di altri microrganismi o parassiti, pratiche di cattura e selezione traumatiche (Frans et al., 2011).

Un monitoraggio sanitario condotto in allevamenti spagnoli di orata e branzino (gabbie a mare e *raceway* a terra) nel biennio 1999-2000 ha evidenziato la circolazione di *V. harveyi* quasi

esclusivamente nel periodo estivo (maggio-novembre), la sua presenza in tutti gli allevamenti considerati, anche in assenza di episodi clinici, ed una maggiore prevalenza nella specie *D. labrax* (Pujalte et al., 2003). Alcuni studi in specie subtropicali hanno rimarcato l'importanza delle soluzioni di continuo cutaneo, evidenziando oftalmite da irruzione secondaria del batterio conseguenti a lesioni traumatiche da manipolazione o distacco di ectoparassiti (Kraxberger-Beatty et al., 1990; Pakingking et al., 2018). Inoltre prove di infezione per immersione in ibridi di cernia hanno causato sintomatologia e mortalità solo in presenza di abrasione del derma, applicando concentrazioni estremamente basse di sospensione batterica ( $1 \times 10^1$  ufc/ml), mentre esemplari integri sono apparsi estremamente resistenti anche a dosi elevate ( $2,76 \times 10^6$  ufc/ml) (Shen et al., 2017).

Le vie di eliminazione più probabili sono rappresentate dalle feci, per frequente osservazione di enterite sierosa, e dalle lesioni cutanee.

### 1.3 Caratterizzazione polifasica di *V. harveyi*

#### 1.3.1 Crescita in coltura ed identificazione fenotipica

*Vibrio harveyi* è un batterio Gram negativo, corto bacillo, lievemente curvo, pleomorfo, anaerobio facoltativo, mobile per singolo flagello polare, con dimensioni variabili tra gli autori:  $1,0-1,6 \times 0,5-0,7 \mu\text{m}$  (Buller, 2014);  $1,9-3,0 \times 1,2-1,4 \mu\text{m}$  (Shen et al., 2017);  $1,6-2,2 \times 1,0-1,1 \mu\text{m}$  (Tu et al., 2017). Capace di metabolismo ossidativo e fermentativo, è ossidasi e catalasi positivo. *V. harveyi* è un microrganismo alofilo e manifesta crescita a concentrazioni di NaCl comprese tra 1 - 7 % (0,5 - 8 % ceppo ATCC35084) e temperatura compresa tra 10 - 40 °C, la crescita è assente a 42°C. Crescita ottimale si osserva a pH 7, salinità del 2% NaCl e temperatura di 25 - 28°C. Può presentarsi sciamante su alcuni terreni (TSA2% NaCl, Marine Sea Salt Agar) e non su altri (Marine Agar 2216, TCBS). Fermenta il  $\beta$ -gentiobiosio, il D-glucuronate, non fermenta l'arbutina, l'idrolisi della caseina è variabile. La reazione di Voges-Proskauer è negativa, l'ureasi può essere variabile; gelatinasi e metabolismo del citrato possono richiedere 48-72 ore per evidenziarsi (Buller, 2014).

*V. harveyi* manifesta generalmente sensibilità alla concentrazione più elevata (150  $\mu\text{g}$ ) del test Vibriostatic O/129 (2, 4-diamino-6, 7-di-iso-propylpteridine phosphate) ma risulta resistente a quella inferiore (10  $\mu\text{g}$ ). La maggior parte dei ceppi isolati da specie ittiche fermentano il saccarosio e presentano su terreno selettivo e differenziale TCBS una colorazione giallastra mentre isolati da gamberi peneidi ed altri invertebrati non metabolizzano il saccarosio e presentano in TCBS colorazione verde o blu-verdastra. Una sintesi dei risultati pubblicati delle principali prove biochimiche effettuate su ceppi isolati in specie ittiche, crostacei e molluschi è presentata in Appendice A. *V. harveyi* può manifestare bioluminescenza, attraverso l'enzima luciferasi che, ossidando un composto organico, rilascia energia sotto forma di radiazione luminosa nello spettro visibile. L'espressione dell'enzima è regolata mediante *quorum sensing*. La maggior parte dei ceppi isolati da gamberi peneidi presenta luminescenza in vivo ed in vitro, mentre numerosi ceppi di specie

ittiche non evidenziano luminescenza in vitro. *V. harveyi* può evidenziare  $\alpha$  e  $\beta$ -emolisi in AS contro eritrociti di montone ed è frequentemente emolitico nei confronti di eritrociti di coniglio (Zhang & Austin, 2000). Prove biochimiche utili a differenziare fenotipicamente *V. harveyi* dai congeneri *V. campbellii* e *V. alginolyticus* sono la positività per ornitina decarbossilasi (*V. campbellii* è ODC negativo), ureasi frequentemente positiva, test VP negativo e assente crescita a 42°C (*V. alginolyticus* è ureasi negativo; VP variabile e cresce a 42°C)(Buller, 2014).

### 1.3.2 Identificazione biomolecolare

Numerosi metodi molecolari sono stati indagati per perfezionare l'identificazione tassonomica all'interno del genere *Vibrio* e segnatamente delle specie filogeneticamente più prossime a *V. harveyi* (clade *Harveyi*). Generalmente i metodi molecolari combinano un maggior potere discriminatorio e una maggior riproducibilità rispetto ai test fenotipici in quanto sono in grado di rilevare minime differenze del genoma e si basano su target molecolari più stabili rispetto alle caratteristiche metaboliche (Sethi et al., 1996).

Dalle prime comparazioni di sequenze del gene *16S* rRNA, poco discriminanti (Dorsch et al., 1992) e dall'ibridazione DNA/DNA, specifica ma difficilmente applicabile (Gomez-Gil, 2004), si è progredito all'applicazione di MultiLocus Sequence Analysis (MLSA) analizzando fino a nove differenti marker filogenetici (geni housekeeping) ubiquitari nel genere *Vibrio* (*ftsZ*, *gapA*, *gyrB*, *mreB*, *pyrH*, *recA*, *rpoA*, *topA* e *16S* rRNA)(Sawabe et al., 2007; Sawabe et al., 2013). Da queste analisi è stato possibile identificare dei geni target (analisi di singolo locus) utili a distinguere *V. harveyi* dai congeneri più prossimi. La sequenza del gene *pyrH* codificante per l'uridina monofosfato chinasi (amplificato di 450-490 bp) appare promettente evidenziando all'interno del clade *Harveyi* la più bassa similarità di sequenza (95%) (Thompson et al., 2005). Questo gene è stato applicato con successo nella identificazione di ceppi ambientali del genere *Vibrio* isolati da acque e sedimenti marini (Tall et al., 2013).

Il gene *toxR*, identificato inizialmente in *V. cholerae* come codificante per il *transmembrane transcription regulator toxR* (Miller & Mekalanos, 1984), appare presente in numerose specie di *Vibrio*, patogene o non patogene, e sembra associato alla regolazione dell'espressione di geni codificanti per proteine della membrana esterna (Okuda et al., 2001). L'analisi filogenetica della sequenza *toxR* appare discriminante all'interno del clade *Harveyi* (Pascual et al., 2010). Il gene presenta una porzione ben conservata ed una regione ipervariabile (Kim et al., 1999): su quest'ultima sono state sviluppate PCR end-point specie-specifiche per *V. harveyi* (Conejero & Hedreyda, 2003; Pang et al., 2006). Cano-Gomez (et al., 2011) rileva che la specificità di questi metodi, che non richiedono sequenziamento dell'amplificato, deve essere ulteriormente verificata per alcune specie del clade *Harveyi* (*V. rotiferianus*).

### 1.3.3 Filogenesi

Le specie classificate nel clade *Harveyi* secondo un'analisi multilocus (Sawabe et al., 2013) sono *V. harveyi*, *V. alginolyticus*, *V. campbellii*, *V. mytili*, *V. natriegens*, *V. parahaemolyticus*, *V. rotiferianus*, *V. azureus* (Yoshizawa et al., 2009) e *V. communis* (Chimetto et al., 2011). Quest'ultima specie è considerata attualmente sinonimo junior di *V. owensii* (Urbanczyk et al., 2013)

Più recentemente nuove specie sono state ascritte al clade *Harveyi* sulla base di analisi MLSA: *V. sagamiensis* (Yoshizawa et al., 2010) isolato dall'acqua marina; *V. owensii* (Cano-Gómez et al., 2010) isolato in larve di crostacei (*Penaeus monodon* e *Palinurus ornatus*); *V. jasicida* (Yoshizawa et al., 2012) isolato da *Jasus verreauxi*, *Salmo salar* e *Haliotis* sp.; *Vibrio inhibensis* (Balcázar et al., 2012) isolato da feci di cavalluccio marino (*Hippocampus guttulatus*)

Le specie associate al clade *Harveyi* presentano tratti fenotipici e genotipo molto simili tra loro, mentre nella specie *V. harveyi* sono state evidenziate nel tempo, in singoli ceppi isolati, variazioni del fenotipo e del genotipo (plasticità genomica) dovute a eventi genetici come mutazioni puntiformi (Thompson et al., 2004), riarrangiamento cromosomico, duplicazione (Zhang et al., 2001), infezione da batteriofagi (Vidgen et al., 2006) e trasferimento genico orizzontale (Tagomori et al., 2002).

### 1.3.4 Proteomica mediante MALDI-TOF

L'identificazione batterica mediante analisi della componente proteica tramite spettrometria di massa sta acquisendo una crescente popolarità in microbiologia, grazie alla semplicità e rapidità di esecuzione, riduzione dei costi per singola analisi ed elevata specificità. La spettrometria di massa (SM) è una tecnica analitica nella quale i composti chimici sono ionizzati in molecole dotate di carica ed il rapporto tra la loro massa e la carica ( $m/z$ ) viene misurato. Sebbene questa tecnica sia stata scoperta già nel primo Novecento è stata perlopiù limitata alle scienze chimiche fino allo sviluppo negli anni '80 dell'*electron spray ionization* (ESI) e del desorbimento/ionizzazione laser assistito da matrice (acronimo anglosassone MALDI) che ne hanno esteso l'applicabilità a composti biologici complessi come le proteine. In ESI e MALDI i peptidi vengono convertiti in ioni mediante l'acquisizione o perdita di uno o più protoni, attraverso metodi di "*soft ionization*" che non pregiudicano significativamente l'integrità del campione (Singhal et al., 2015). I campioni sottoposti a spettrometria di massa MALDI sono preparati mediante mescolamento o rivestimento con una soluzione organica detta matrice che asciugandosi cristallizza insieme al campione in esame. Questa matrice è composta da acqua e una mistura di solventi organici contenenti etanolo/metanolo o acetonitrile ed un acido forte come l'acido trifluoroacetico. Nell'applicazione microbiologica il solvente penetra la parete della cellula batterica e ne estrae le proteine intracellulari (ribosomiali). Evaporando il solvente le proteine co-cristallizzano con la matrice. L'amalgama viene ionizzata all'interno di uno strumento mediante un raggio laser. Gli ioni protonati sono accelerati ad un

potenziale fisso e vengono separati tra loro in base al rapporto massa/carica. I metodi di misurazione degli ioni possono essere molteplici, ma nelle applicazioni microbiologiche viene generalmente impiegato l'analizzatore del tempo di volo (Time of Flight – TOF). Nell'analisi MALDI-TOF il rapporto  $m/z$  di uno ione è misurato determinando il tempo impiegato per percorrere la lunghezza del tubo di volo dello strumento. Sulla base del TOF un caratteristico spettro chiamato *peptide mass fingerprint* (pmf) viene generato per gli analiti presenti nel campione; nel caso dei batteri esso è prevalentemente determinato da proteine ribosomiali costitutivamente espresse. L'identificazione dei microrganismi viene effettuata comparando il pmf ottenuto con gli spettri pmf contenuti in un database di riferimento, ottenendo come risultato un'assegnazione di specie associata ad un punteggio che permette di valutare l'attendibilità dell'identificazione del microrganismo a livello di specie e/o di genere. Tale database di microrganismi rappresenta la componente fondamentale delle piattaforme commerciali MALDI (Bruker, Shimadzu) comprendendo batteri Gram negativi, Gram positivi, aerobi ed anaerobi, micobatteri, micoplasmi, leviti e funghi. Sebbene i database possano essere considerati estremamente completi per quanto riguarda la microbiologia clinica umana non garantiscono ancora lo stesso grado di affidabilità per la microbiologia veterinaria ed in misura ancora minore per la microbiologia ambientale (van Belkum et al., 2017). Essi sono quindi sottoposti ad un costante ingrandimento ed aggiornamento seguendo la scoperta di nuove specie e le variazioni tassonomiche. Per quanto riguarda il database dell'azienda Bruker Daltonics (DB 4613), sono presenti spettri pmf di quasi tutte le specie comprese nel clade *Harveyi* (singolo ceppo) ad eccezione di *V. owensii*, *V. sagamiensis*, *V. jasicida* e *V. inhibensis*.

#### 1.4 Valutazione dell'antibiotico-resistenza

I test di sensibilità agli antibiotici, chiamati anche antibiogramma, permettono la valutazione del profilo di sensibilità di un ceppo microbico verso uno o più antibiotici. I test vengono eseguiti in vitro, ossia in condizioni standardizzate per garantire la riproducibilità e la accuratezza dei risultati, esponendo concentrazioni standard del microrganismo in esame a una serie di ben definite concentrazioni di farmaci. Le metodiche più largamente utilizzate dai laboratori di microbiologia clinica sono la diffusione in agar secondo Kirby-Bauer (manuale e qualitativa) e la microdiluzione in brodo (automatizzabile e quantitativa). La prima metodica prevede la valutazione, su terreno agarizzato, dei diametri degli aloni di inibizione che circondano il punto di deposizione di dischetti antibiotati. Viene eseguita distribuendo uniformemente una sospensione del microrganismo in esame, contenente un numero standardizzato di cellule batteriche (0,5 McFarland) sulla superficie di un terreno di coltura in piastra (Mueller Hinton agar o MH addizionato con NaCl per specie alofile) sul quale poi vengono applicati dischetti di carta bibula ciascuno contenente un antibiotico in concentrazione standard. Le piastre vengono incubate in termostato a temperatura e tempo prestabiliti: 35-37 °C per 16-18 o 24 ore nel caso di patogeni isolati in vertebrati omeoterme, 22°C per 24-28 ore per i microrganismi patogeni dei pesci (CLSI, 2006). Durante l'incubazione, il microrganismo

prolifererà sull'intera superficie del terreno e l'antibiotico diffonderà in modo radiale dal dischetto esponendo il microrganismo ad un gradiente di concentrazione di antibiotico che diminuirà con la distanza dal dischetto.

La microdiluzione in brodo permette di identificare, per le varie molecole testate, la minima concentrazione inibente, in inglese *minimal inhibitory concentration* (MIC), intesa come la più bassa concentrazione del farmaco in grado di inibire la crescita in vitro del microrganismo in analisi. Gli antibiotici distribuiti in concentrazioni scalari (diluizione in base 2) in micropiastre a fondo concavo vengono solubilizzati con il brodo di crescita Cation Adjusted Mueller Hinton Broth (CAMHB) contenente la sospensione batterica ( $5 \times 10^5$  ufc/ml). Le piastre incubate nelle specie ittiche a 22°C per 24-28 ore vengono lette verificando la crescita batterica (torbidità o presenza di un deposito sul fondo) e identificando la MIC per ciascun antibiotico (espressa in µg/ml) (CLSI, 2014a).

I diametri degli aloni di inibizione o le MIC vengono poi rapportati a valori soglia (breakpoint) fissati da alcune istituzioni internazionali per le diverse combinazioni microrganismo-antibiotico: Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) statunitense ed European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Attraverso il confronto con i *breakpoint*, i risultati ottenuti possono essere tradotti nelle cosiddette categorie di interpretazione: sensibile (S), intermedio (I), resistente (R). La correlazione fra le indicazioni ottenibili dai test in vitro e la reale efficacia clinica delle molecole nel singolo caso non è ovviamente assoluta, dipendendo da un insieme complesso di fattori fra i quali grande rilievo hanno: l'effettivo ruolo clinico del microrganismo esaminato; la sede dell'infezione e la possibilità del farmaco di raggiungerla in concentrazioni adeguate; il dosaggio e la corretta modalità e tempistica di somministrazione dell'antibiotico anche in relazione alle caratteristiche farmacocinetiche e farmacodinamiche. Usualmente si considera l'indicazione S come predittiva dell'efficacia del farmaco (se correttamente somministrato), R corrisponde a un'improbabile efficacia del farmaco, I esprime una scarsa sensibilità (quindi una lieve resistenza) ammettendo dunque che il farmaco possa risultare efficace solo qualora si concentri particolarmente nella sede di infezione o sia utilizzato a dosaggi sufficientemente elevati. Nell'ambito ittico le linee guida fornite da CLSI per la determinazione dei *breakpoint* (clinici ed epidemiologici) appaiono molto lacunose, ciò è dovuto alle scarse cognizioni sulla farmacocinetica e farmacodinamica per la maggior parte delle molecole antibiotiche applicabili nelle specie allevate, associate alla variabilità delle caratteristiche ambientali (salinità, temperatura) ed alle peculiarità metaboliche delle differenti specie. L'unica specie batterica per cui esistono *breakpoint* dettagliati risulta essere *Aeromonas salmonicida* (CLSI, 2006).

Nella determinazione futura dei *breakpoint* clinici, specifici per ciascuna associazione antibiotico/specie batterica, risulta determinante ottenere in primis una distribuzione di valori MIC in vitro da un numero adeguato di ceppi (>30), variabili per area geografica e/o specie di isolamento, per identificare dei valori di *cutoff* epidemiologici (*wild-type cutoff*) che separino la popolazione batterica in isolati definiti *wild type* e non *wild type* sulla base della presenza o assenza di meccanismi di resistenza acquisiti o dovuti a mutazioni (CLSI, 2011). Successivamente la raccolta di dati inerenti la

correlazione tra il valore di MIC determinato in vitro e l'esito clinico di terapie svolte in determinate specie ittiche, secondo le posologie raccomandate (letteratura, ditte farmaceutiche) potrà essere impiegata per generare valori di *cutoff* clinico (CLSI, 2014a).

#### 1.4.1 Terapia antibiotica nei confronti delle vibriosi

Nell'area mediterranea (Spagna, Croazia, Grecia) l'approccio terapeutico alle infezioni sostenute da *V. anguillarum* nel branzino e ombrina boccadoro (*Argyrosomus regius*), in seguito a rotture vaccinali dovute a progressivo esaurimento della copertura anticorpale o per infezioni da sierotipi differenti da quelli inclusi nelle preparazioni vaccinali, è basato principalmente sulla somministrazione di mangime medicato (flumequina, sulfamidico potenziato e ossitetraciclina) (Haenen et al., 2014). Nel contesto italiano, dove l'applicazione della profilassi vaccinale è meno uniformemente diffusa, le molecole principalmente impiegate contro *V. anguillarum* sono flumequina e sulfadiazina in associazione con trimethoprim, meno frequentemente florfenicolo. La posologia della flumequina impiegata in premiscela è di 12 mg/kg p.v./die (dose suddivisa in due somministrazioni) per 5 giorni di terapia, con tempo di sospensione di 8 giorni (Chemifarma S.p.A.). Sulfadiazina e trimethoprim vengono impiegati in premiscela alla dose di 24 mg + 4,8 mg/kg p.v./die per 5-7 giorni di terapia, con tempo di sospensione di 250-500 °C/giorno (Fatro S.p.A.; Virbac inc.). Il florfenicolo viene impiegato in deroga come premiscela alla dose di 10-15 mg/kg p.v./die per 8 giorni di terapia, con tempo di sospensione di 135°C/giorno (MSD Animal Health S.r.l.). Dati sul trattamento di infezioni da *V. harveyi* nel branzino sono ancora limitati, ma l'applicazione di sulfamidico potenziato è apparsa efficace (Sarti, comunicazione personale).

#### 1.4.2 Studi di antibiotico-resistenza in *V. harveyi*

I report pubblicati sulla valutazione dell'antibiotico-resistenza nella specie *V. harveyi* sono piuttosto limitati. Uno studio eseguito su un ceppo patogeno isolato in ibrido di cernia (*Epinephelus fuscoguttatus* × *E. lanceolatus*) mediante metodo Kirby-Bauer (Shen et al., 2017) ha riscontrato resistenze multiple nei confronti di penicilline (penicillina, oxacillina, ampicillina, carbenicillina, piperacillina), cefalosporine (cefalessina, cefazolina, cefradina, cefuroxime, ceftazidina, cefoperazone), aminoglicosidi (gentamicina, kanamicina, neomicina), tetraciclina ed eritromicina evidenziando suscettibilità esclusivamente a minociclina, doxiciclina e ceftriaxone. Antibiogrammi eseguiti mediante Kirby-Bauer su un più ampio spettro di molecole e su una trentina di ceppi di *V. harveyi* isolati in differenti province cinesi nel medesimo ibrido di cernia (Zhu et al., 2018) ha confermato la resistenza a molecole appartenenti alle penicilline (penicillina, oxacillina, ampicillina, carbenicillina, amoxicillina), polipeptidi (virginiamicina, polimixina B), lincomicine (lincomicina, clindamicina), acetilspiramicina, streptomina e bacitracina nel 90-100% dei ceppi. Resistenze



variabili sono state rilevate per rifampicina (23,3% dei ceppi esaminati), kanamicina (16,7%), tetraciclina e doxiciclina (26,7%), sulfametossazolo-trimethoprim (30,3%). È stata evidenziata per tutti i ceppi analizzati la sensibilità a quinoloni (enrofloxacin, norfloxacin, ofloxacin, ciprofloxacina, acido nalidixico), fenicoli (cloramfenicolo, florfenicolo),  $\beta$ -lattamici (ceftazidime, cefepima, cefoxitina, imipenem) e minociclina. L'interpretazione degli aloni di inibizione si è basata sulla categorizzazione in 5 livelli in base al diametro (mm), valida trasversalmente per tutte le molecole analizzate ( $D = 0$ , completa resistenza;  $6 < D \leq 12$ : elevata resistenza;  $12 < D \leq 18$ : sensibilità intermedia;  $18 < D \leq 24$ : elevata sensibilità;  $24 < D$ : estrema sensibilità) (Zhu et al., 2018). Antibiogrammi eseguiti su due ceppi isolati da acqua marina, prelevati in prossimità di allevamenti di bivalvi in Corea (Kang et al., 2014), hanno evidenziato resistenze nei confronti di ampicillina, cefotaxime, cefotetan, cefalotina, cefepime, streptomina e vancomicina; risultati intermedi per eritromicina, gentamicina, kanamicina, rifampicina, acido nalidixico; mentre hanno evidenziato sensibilità nei confronti di cloramfenicolo, ciprofloxacina, tetraciclina e sulfametossazolo-trimethoprim.

## 1.5 Cenni di immunità nei teleostei

### 1.5.1 Leucociti

Nei teleostei è possibile distinguere nel circolo periferico differenti tipologie cellulari: eritrociti, trombociti e leucociti. I leucociti si distinguono in base al rapporto nucleo/citoplasma in linfociti e plasmacellule, caratterizzati da predominanza nucleare, e monociti/macrofagi e granulociti con predominanza del citoplasma. Nei teleostei sono riportate tre tipologie di granulociti: eterofili, acidofili e basofili; distinti in base alla morfologia e alle caratteristiche perossidasiche dei granuli in essi contenuti. La prevalenza relativa dei diversi tipi cellulari varia significativamente da specie a specie. Nella carpa si osserva la predominanza dei granulociti eosinofili che costituiscono circa l'8 % dei leucociti ematici, mentre eterofili e basofili costituiscono meno dell'1%. Nei salmonidi i granulociti eterofili predominano sugli altri due tipi cellulari (Secombes, 1996). In *D. labrax* le popolazioni cellulari circolanti sono state valutate in dettaglio (Esteban et al., 2000) (Tabella 3). Nel branzino sono stati evidenziati unicamente granulociti eterofili ed eosinofili. Le due popolazioni appaiono distinguibili per l'affinità tintoriale del citoplasma in colorazione di Giemsa (bluastro negli eterofili, non colorabile negli eosinofili), maggior numero di lobature del nucleo e maggior abbondanza di RER e apparato di Golgi negli eterofili valutati in ultrastruttura.

## SEA BASS BLOOD CELLS

**TABLE 1. Size, surface, and cytoplasmic features of sea bass blood cells\***

Cell type	Cell size ( $\mu\text{m}$ mean $\pm$ SD)	Cell surface	Cytoplasmic features
Erythrocyte	10.47 $\pm$ 2.7 ×	Slightly waved	A few organelles, marginal band of microtubules
Thrombocyte round	2.59 $\pm$ 0.62 4.33 $\pm$ 0.78	Smooth with crater-like depressions	SCCS Marginal band of microtubules
Fusiform	7.72 $\pm$ 2.19 ×		
Heterophilic granulocyte	2.95 $\pm$ 0.28 6.38 $\pm$ 1.04	Rugged with cell processes and folds	Three granule populations
Acidophilic granulocyte	5.39 $\pm$ 0.77	Rugged with cell processes and folds	Three granule populations
Lymphocyte	3.88 $\pm$ 0.87	Short microvilli	Free ribosomes, large mitochondria, occasional granules
Plasma cell	3.6 $\pm$ 0.90		A well developed RER
Monocyte and monocyte/macrophage	6.06 $\pm$ 0.96	Irregular cell processes ridges and protrusions	Abundant organelles, lysosomes

\*SCCS, surface connected canaliculi system. RER, rough endoplasmic reticulum.

**Tabella 3:** Caratteristiche delle popolazioni cellulari evidenziabili nel circolo ematico in *D. labrax* secondo Esteban (et al., 2000).

### 1.5.2 Immunità innata

L'immunità innata o non specifica rappresenta per i teleostei una componente essenziale al contrasto degli agenti patogeni, sia nelle prime fasi di sviluppo embrionale e larvale che nella vita adulta. Nei pesci questo sistema difensivo presenta un numero di componenti ed una differenziazione maggiore rispetto agli omologhi nei mammiferi, in particolare presenta una maggior reattività della via alternativa di attivazione del complemento (Sunyer & Tort, 1995). I pesci ossei, in quanto organismi poichilotermi, possono presentare ritardi nell'attivazione dell'immunità adattativa a temperature inferiori all'optimum di specie, al contrario della risposta innata che appare normalmente efficace (Yano, 1996). A seguito di soluzioni di continuo nelle barriere fisiche, costituite dal rivestimento epiteliale cutaneo e mucosale, il sistema immunitario innato attiva molteplici componenti quali fattori umorali (lisozima, transferrina, complemento, proteina C-reattiva, lectine ed emoagglutinine) e difese cellulari (macrofagi, granulociti, cellule citotossiche non-specifiche, cellule endoteliali, cellule granulari eosinofile) che interagiscono per contrastare la proliferazione dei microrganismi patogeni (Yano, 1996; Secombes, 1996). Questo elaborato sistema viene definito innato in relazione alla sua non specificità. Molecole quali lipopolisaccaridi, peptidoglicani e  $\beta$ -glucani costituenti della parete cellulare di molti microrganismi presentano dei domini comuni detti *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) o *microbe-associated molecular pattern* (MAMPs) che vengono riconosciuti da recettori del sistema innato detti *pattern recognition receptor* (PRRs) umorali e solubili (*C-type lectine receptor*, *Mannose binding lectine* MBL) o cellulari quali *Toll-like receptors* (TLRs) e *NOD-like receptors* (Rebl et al., 2010). Il legame recettore-ligando indica la presenza di un organismo estraneo al self nell'ambiente extracellulare e determina l'attivazione di fattori di trascrizione cellulari, mediatori della risposta infiammatoria o l'attivazione del complemento.

Il complemento nei pesci ossei presenta le medesime vie di attivazione presenti nei mammiferi (complesso antigene anticorpo, via alternativa associata ai PAMPs e via lectinica) (Nakao et al., 2006) e porta alla attivazione del complesso litico (*membrane attack complex* – MAC) che svolge una funzione chiave nella lisi osmotica delle cellule microbiche. Inoltre frammenti prodotti dalla cascata del complemento sono implicati nell'opsonizzazione delle cellule batteriche stimolandone la fagocitosi da parte di macrofagi e in misura minore dai granulociti e agiscono come fattori chemotattici (anafilotossine – C5a-like). Generalmente il complemento nei teleostei presenta la maggior attività battericida a temperature comprese tra 15-25°C, mantenendola fino a 0-4°C (Koppenheffer, 1987), mentre risulta inattivato a temperature tra 45-54°C per 20 minuti (Suner & Tort, 1994). L'immunità innata cellulare è sviluppata da macrofagi e granulociti attraverso meccanismi di fagocitosi e burst respiratorio intracellulare (fagolisosomi) connesso alla produzione di specie reattive dell'ossigeno ROS e specie reattive dell'azoto (RNS) come l'ossido nitrico. I granulociti sono inoltre in grado di rilasciare nel medium extracellulare il contenuto dei granuli primari (degranolazione) e produrre strutture fibrillari dette *neutrophil extracellular trap* (NETs) costituite da DNA, istoni e proteine granulari che intrappolano e distruggono i microrganismi (Palić et al., 2007). I granulociti sono il primo tipo cellulare circolante ad essere richiamato da processi infiammatori tissutali, seguiti poi dai monociti/macrofagi. Il rilascio di mediatori dell'infiammazione quali amine vasoattive (istamina e 5-idrossitriptamina) da parte di trombociti e cellule granulari eosinofile indotto da anafilotossine, e la sintesi di eicosanoidi e citochine da parte dei primi fagociti attivati stimolano e modulano la diapedesi cellulare nel sito di infezione (Secombes, 1996). L'apice della risposta fagocitica si osserva nei primi giorni dopo l'infezione iniziale e successivamente il loro stato d'attivazione ed il loro numero decresce per emigrazione o per lisi cellulare (Secombes, 1996).

### 1.5.3 Immunità adattativa-specifica

#### 1.5.3.1 Organi linfoidi

Gli organi linfoidi nei teleostei sono costituiti dal rene, timo, milza e tessuto linfoide associato alle mucose MALT (cute, intestino e branchie). Gli organi linfoidi primari o generativi, rene e timo, sono i siti dove vengono prodotti o maturano i linfociti. Il rene cefalico ed in misura minore il rene del tronco presentano attività linfo-emopoietica comparabile al midollo osseo dei vertebrati superiori. Il tessuto interstiziale renale è costituito da cellule staminali emopoietiche, mieloblasti, linfoblasti (Ig+) e centri melanomacrofagici immersi in uno stroma reticolare fibroblastico e vasi sinusoidi (Zapata et al., 1996). Il timo nei teleostei si rileva in prossimità della camera branchiale in continuità con l'epitelio faringeo. Esso appare circondato da una capsula connettivale costituita da fibroblasti, macrofagi e tralci connettivali che si estendono nel parenchima interno formato da cellule epiteliali, cellule dendritiche, linfociti T o timociti (Ig-), cellule mieloidi e macrofagi. La milza costituisce il principale

organo linfoide periferico secondario, finalizzato all'intrappolamento e processazione degli antigeni ed è composto da vasi ellipsoidi, tessuto linfoide, centri melonomacrofagi e cellule stromali reticolari (Zapata et al., 1996). Il tessuto linfoide associato alla mucosa intestinale (GALT) nei teleostei è costituito da un accumulo linfoide non capsulato nella lamina propria composto da linfociti, macrofagi, plasmacellule e granulociti. L'ontogenesi degli organi linfoidi è stata valutata istologicamente in differenti specie di teleostei, evidenziando differenze temporali significative tra specie d'acqua dolce e marine; in particolare le specie marine presentano un ritardo nella colonizzazione linfoitaria degli organi (Jósefsson & Tatner, 1993). Il primo organo a presentare linfociti identificabili nelle specie d'acqua dolce (*Oncorhynchus mykiss* (Tatner & Manning, 1983), *Cyprinus carpio* (Botham & Manning, 1981), *Salmo salar* (Ellis, 1977)) e marine (*Sparus aurata* (Jósefsson & Tatner, 1993)), è il timo, tuttavia si ritiene che i precursori dei timociti siano originati precocemente nel rene cefalico da cellule progenitrici emo-linfopoietiche (Zapata & Cooper, 1990). La milza ed il MALT appaiono linfoidi successivamente. Linfociti identificabili appaiono nel salmone circa 2-3 settimane prima della schiusa, nella carpa 3-7 dph mentre nell'orata sono osservabili nel timo a 47 dph e nel rene a 54 dph. In *Gadus morhua* rene cefalico e milza sono i primi organi a svilupparsi e sono presenti alla schiusa evidenziando linfociti a 50 dph, mentre l'istogenesi del timo si osserva a 30 dph (Schroder et al., 1998). In *D. labrax* la presenza di linfociti T identificabili nel timo mediante ibridazione *in situ* si osserva a partire da 51 dph (Picchiatti et al., 2009), mentre l'espressione di geni codificanti per T Cell Receptor  $\beta$  appare presente già a 21 dph (Picchiatti et al., 2008). Si ipotizza che nel branzino la componente cellulare del sistema immunitario acquisito presenti funzionalità a partire dal 45-50 dph (Galindo-Villegas & Mulero, 2014).

### 1.5.3.2 Cellule implicate nell'immunità adattativa

L'immunità adattativa o specifica, nota anche come immunità acquisita, è una risposta immunitaria caratterizzata da elevata specificità e da memoria immunologica (risposta anamnestic). Essa risponde ad uno specifico agente patogeno ed è generalmente più efficace dell'immunità innata, sebbene richieda più tempo di quest'ultima per svilupparsi. L'immunità adattativa si divide in immunità umorale e immunità cellulomediata. Le cellule effettrici coinvolte in questo tipo di risposta sono i linfociti, i quali possiedono meccanismi genetici unici (riarrangiamento cromosomico e mutazioni) che operano sui loci che codificano sui recettori antigenici generando in questi una elevatissima variabilità fenotipica. Una categoria di linfociti matura nel timo (linfociti T) ed è in grado, grazie a specifici recettori TCR, di riconoscere frammenti di antigene legati a molecole comprese nel complesso maggiore di istocompatibilità o *major histocompatibility complex* (MHC). Il MHC di classe I è espresso da molti tipi cellulari ed implicato nel riconoscimento del self e non-self (immunità cellulomediata, fenomeno del rigetto), tuttavia esistono alcune linee cellulari specializzate dette cellule presentanti l'antigene - CPA (cellule dendritiche, macrofagi, granulociti e linfociti B) che

utilizzano MHC di classe II e sono implicate nella risposta umorale (Cuesto et al., 2006). La risposta umorale coinvolge i linfociti B, cellule che maturano nel rene dei teleostei e primariamente producono e secernono anticorpi (immunoglobuline o Ig) e vengono distinti in due subpopolazioni B1 e B2. I linfociti B1 sono indipendenti dal controllo dei linfociti T, appaiono in grado di attuare fagocitosi di microrganismi e produrre anticorpi a bassa affinità e specificità equivalenti agli anticorpi naturali prodotti dai mammiferi (Avrameas & Ternynck, 1995); inoltre sembrano svolgere un ruolo simile alle cellule dendritiche dei mammiferi integrando la risposta innata a quella adattativa (Zhu et al., 2014). I linfociti B2 attivati producono anticorpi specifici e richiedono l'interazione con cellule CPA e linfociti T. Le due popolazioni linfocitarie (B e T) possono essere distinte in base alla presenza o meno di immunoglobuline (IgM) sulla membrana plasmatica; i linfociti B appaiono IgM<sup>+</sup> mentre i linfociti T IgM<sup>-</sup> (Clem et al., 1991). Nei teleostei i linfociti T svolgono molteplici funzioni mediate da due differenti sub-popolazioni (linfociti T-helper e linfociti T-citotossici). I linfociti T-helper che esprimono cluster di differenziazione (CD4), cooperano con i linfociti B per incrementare la loro produzione anticorpale interagendo con MHC classe II, mentre i linfociti T-citotossici (CD8) operano la distruzione diretta di cellule target (immunità cellulomediata) attivati da MHC classe I. I segnali chimici che attivano e regolano il sistema immunitario specifico dopo l'incontro con un antigene riconosciuto come non self sono basati su citochine quali: interferone, interleuchine, colony stimulating factor o tumor necrosis factor (Secombes, 1996). A differenza dei mammiferi che esprimono più classi di immunoglobuline (IgG, IgE, IgM, IgD, IgA) nei pesci sono state riconosciute principalmente le IgM, secrete non solo in forma tetrameric (sierica) ma anche in configurazione dimerica e monomerica (Magnadottir, 1998), IgD (Stenvik et al., 2001), e immunoglobuline mucosali IgT (Hansen et al., 2005) e IgZ (Danilova et al., 2005). Nei teleostei le plasmacellule possono essere distinte in cellule a vita breve e cellule a vita lunga o memory cell, queste ultime localizzate nel rene cefalico. La memoria immunologica nei teleostei è un tema dibattuto e sebbene la risposta anamnestic sia sensibilmente inferiore a quella dei mammiferi per intensità, rapidità e persistenza sia l'espansione clonale dei linfociti B (Fillatreau et al., 2013) che l'incremento di specificità anticorpale (affinity maturation) a seguito di esposizioni successive ad un patogeno sono state dimostrate nei teleostei (Ye et al., 2011).

### 1.5.3.3 Immunità mucosale

La prima linea di azione della difesa umorale, dove i microrganismi possono essere riconosciuti e neutralizzati, è rappresentata dalle superfici mucose. Esse non rappresentano semplicemente una barriera fisica, ma ospitano un tessuto linfoide associato denominato MALT (*mucosa-associated lymphoid tissue*). In particolare il tratto intestinale presenta un *gut-associated lymphoid tissue* (GALT) costituito da una popolazione di linfociti, plasmacellule, granulociti e macrofagi localizzati sia nel connettivo della lamina propria che tra le cellule epiteliali intestinali (Picchietti et al., 1997),

prevalentemente attive nella metà distale del tratto intestinale (Rombout et al., 2014). Nei teleostei e in particolare nel branzino non sono state evidenziate tuttavia le strutture tipiche del GALT osservate nei mammiferi: placche del Peyer, cellule M, sintesi locale di IgA (Galindo-Villegas & Mulero, 2014).

## 1.6 Vaccinazione

### 1.6.1 Finalità e tipologie vaccinali

Storicamente la prima evidenza di vaccinazione è riferita ad Edward Jenner, il quale dimostrò nel 1796 che l'iniezione di materiale ottenuto da pustole di vaiolo bovino (*Vaccinia virus*) proteggeva l'uomo dall'infezione di vaiolo umano (*Variola virus*) (Jenner, 1798). Circa 150 anni più tardi anche nei teleostei si evidenziò la capacità di sviluppare una risposta immunitaria anamnesticamente protettiva, immunizzando una carpa con *Aeromonas punctata* inattivata termicamente (Snieszko et al., 1938) tramite inoculo. Successivamente l'immunizzazione orale fu impiegata sperimentalmente con successo per proteggere *Oncorhynchus clarkii* contro *Aeromonas salmonicida* (Duff, 1942). Nei due decenni successivi l'avvento degli antibiotici (sulfamidici) ridusse l'interesse nello sviluppo di vaccini nei pesci, tuttavia già a partire dalla fine degli anni '60 l'emergenza di ceppi batterici antibiotico-resistenti e la consapevolezza dei pericoli potenziali per l'uomo connessi ai trattamenti antibiotici nei pesci rifocalizzò la ricerca verso la vaccinologia. Il primo vaccino commerciale per l'impiego nei pesci fu autorizzato in USA nel 1976 contro *Yersinia ruckeri*. Attualmente la vaccinazione è considerata il metodo più efficace per prevenire l'insorgenza di malattie infettive nei pesci (Sakai, 1999). L'obiettivo della vaccinazione è sviluppare in un individuo una risposta immunitaria protettiva nei confronti di una malattia infettiva. La protezione indotta dal vaccino presenta rischi inferiori rispetto all'immunizzazione ottenuta a seguito di una infezione naturale e similmente a quest'ultima garantisce, in virtù delle memory cell una risposta anamnesticamente (di durata variabile) che previene la manifestazione clinica dell'infezione. L'esposizione naturale all'agente eziologico successiva alla vaccinazione stimola una risposta anticorpale ed il mantenimento dell'immunità. In assenza di esposizione naturale un richiamo vaccinale o vaccinazione *booster* è necessaria per mantenere la copertura vaccinale (Ellis, 1988).

Nell'ambito dei vaccini batterici è possibile distinguere sei categorie (Pridgeon & Klesius, 2012):

- bacterin (cellula batterica inattivata generalmente con formalina)
- batteri vivi attenuati
- tossoidi: vaccino contenente tossine inattivate (in genere termicamente) in assenza di cellule batteriche
- vaccino a sub-unità contenente una proteina batterica purificata (frammento o sub-unità del batterio) associata generalmente ad un adiuvante
- vaccini coniugati ottenuti coniugando una proteina di membrana del batterio target con un'altra proteina maggiormente immunogena
- vaccini a DNA

Le tre tipologie di vaccini più estensivamente applicate in acquacoltura sono: vaccini batterici a microrganismo intero, vaccini a subunità, vaccini a DNA (Clark & Cassidy-Hanley, 2005). I vaccini basati su microrganismo intero sono stati per lungo tempo gli unici vaccini disponibili e presentano al sistema immunitario dell'ospite una ampia varietà di antigeni esposti dal patogeno. Ciò può esitare in alcuni casi in una relativa cross-protezione tra patogeni simili tra loro, come avviene per Vaccinia virus e Variola virus nell'uomo, mentre in altri casi tale cross protezione risulta assente, come evidenziato per i diversi sierotipi di *Vibrio anguillarum*. Vaccini inattivati risultano molto sicuri in quanto il microrganismo non prolifera e non induce infezione nell'organismo, tuttavia a paragone dei vaccini attenuati risulta generalmente meno immunogeno e non in grado di indurre una robusta risposta adattativa cellulomediata. Inoltre un patogeno inattivato non è in grado di sintetizzare nell'ospite fattori di virulenza proteici (tossine) che sono connessi alla sua patogenicità e potenzialmente risultano immunogeni e protettivi.

Con l'avvento dell'ingegneria genetica è stato possibile sviluppare più facilmente vaccini vivi attenuati, eliminando specifici fattori di virulenza nel genoma dei microrganismi, consentendo ad essi di indurre infezione nell'ospite senza causare malattia clinica, riducendo al contempo i costi di produzione e processazione del vaccino. Tuttavia il pericolo di una rivirulentazione ad opera di elementi trasponibili presenti nell'ambiente ne ha significativamente limitato la diffusione.

I vaccini a sub-unità si basano sulla produzione di uno specifico antigene ottenuto dalla purificazione del microrganismo in coltura, espresso da sistemi eucarioti (ciliati), procarioti (batteri) o sintetizzato chimicamente (peptidi). Le difficoltà di sviluppo sono legate alla corretta identificazione delle proteine antigeniche target (altamente immunizzanti) e la loro espressione corretta nella struttura terziaria tridimensionale. L'avvento di sistemi di espressione eucarioti come il ciliato *Tetrahymena thermophila* sembra in grado di superare i limiti di espressione proteica riscontrati nei sistemi batterici (Weide et al., 2006). I vantaggi principali sono che la preparazione vaccinale a sub-unità non contiene tossine indesiderate o componenti immunosoppressive ed è applicabile nello sviluppo di vaccini contro parassiti. I vaccini a DNA si basano sull'iniezione nell'ospite di un plasmide contenente una sequenza genica codificante per un antigene proteggente che viene espresso *in situ* sfruttando il sistema trascrizionale e trasduzionale dell'ospite (Liu, 2003).

## 1.6.2 Impiego di adiuvanti vaccinali

Gli adiuvanti sono sostanze utilizzate per incrementare la risposta immunitaria al fine di ridurre la quantità di antigene somministrato e prolungare la protezione nel tempo. Essi generalmente determinano un aumento della captazione degli antigeni da parte delle CPA, un aumento della risposta cellulomediata e umorale mediata dai linfociti T e un aumento della risposta immunitaria aspecifica, inoltre garantiscono un rilascio progressivo e prolungato degli antigeni. In alcune patologie batteriche, in cui gli antigeni proteggenti sono costituiti da lipopolisaccaridi (*Vibrio* sp., *Yersinia ruckeri*) considerati antigeni indipendenti dall'attivazione dei linfociti T, l'utilizzo di adiuvanti non produce alcun beneficio, mentre in altre malattie (*Aeromonas salmonicida*, *Renibacterium salmoninarum*) la somministrazione di vaccino inattivato risulta protettiva solo in associazione con adiuvante (Ellis, 1988; Hamid, 2003). Gli adiuvanti commercialmente disponibili sono applicati prevalentemente nelle formulazioni iniettive, meno frequentemente per immersione o per via orale e si basano su composti oleosi (olio minerale o vegetale), glucani o sali di alluminio.

Tra i composti oleosi l'adiuvante completo di Freund, costituito da olio minerale contenente cellule inattivate di *Mycobacterium tuberculosis* in cui l'antigene target (in soluzione salina) viene emulsionato, è stato storicamente largamente impiegato. Questa emulsione può essere somministrata unicamente per iniezione. Sfortunatamente questo composto, elicitando una intensa risposta infiammatoria, può determinare effetti indesiderati quali granulomi e necrosi muscolare nel sito di inoculo (via intramuscolare) o adesione dei visceri con reazioni granulomatose e melanizzazione (via intraperitoneale), oltre ad una riduzione dell'accrescimento. Più recentemente sono stati sviluppati composti a base di oli minerali e oli metabolizzabili e surfactanti in grado di mantenere stabilmente l'emulsione olio/antigene in soluzione acquosa (Montanide™, Seppic) riducendo in parte gli effetti collaterali dell'adiuvante completo di Freund. Adiuvanti impiegati efficacemente nella vaccinazione nei mammiferi a base di sali di alluminio, come idrossido di alluminio associato a saponine o solfato di alluminio potassio (allume), hanno evidenziato nella trota iridea ridotti o assenti effetti adiuvanti e significativi effetti collaterali quali peritonite e riduzione dell'accrescimento (Horne et al., 1984; Cossarini-Dunier, 1985). Tuttavia l'applicazione di allume di potassio in preparazioni vaccinali per immersione contro *Vibrio anguillarum* ha evidenziato un aumento della captazione dell'antigene (Tatner & Horne, 1983), mentre formulazioni orali adjuvate con allume contro *V. anguillarum* hanno prodotto una risposta immunitaria protettiva a seguito di somministrazione prolungata (8 settimane) e garantito una maggior protezione rispetto al controllo non adjuvato (Agius et al., 1983). L'applicazione di dimetilsolfossido (DMSO) in vaccinazione per immersione ha evidenziato una maggior risposta anticorpale in trota nei confronti di *Y. ruckeri* (Ellis, 1988). Come prodotto registrato in Europa applicabile in immunizzazione mucosale per immersione è disponibile il Montanide™ IMS (Seppic) in microemulsione oleosa (10-500 nm).



### 1.6.3 Vie di somministrazione

Le vie di somministrazione dei vaccini sono molteplici e variano dall'iniezione intraperitoneale (IP) o intramuscolare (IM) all'immersione (diretta o iperosmotica), alla via orale fino alla adspersione o vaccinazione spray. Il metodo che generalmente garantisce la maggior protezione è l'iniezione IP, grazie alla possibilità di applicare adjuvanti, seguito dall'immersione e dalla vaccinazione orale. Tuttavia in termini di praticità di somministrazione la vaccinazione orale è la più semplice da applicare, seguita dall'immersione ed in ultimo dall'iniezione. L'iniezione IP richiede infatti l'anestesia degli esemplari e una manipolazione che risulta tempo-disperdente e produce il maggior livello di stress nei pesci, oltre a richiedere manodopera specializzata. Inoltre risulta difficilmente applicabile in esemplari di taglia inferiore ai 15 g. Per le taglie inferiori ai 15 g la somministrazione per immersione appare la più consigliabile e può essere effettuata semplicemente raccogliendo gli esemplari ed esponendoli in vaschette apposite ad una soluzione di vaccino (diluito 1:10 per la maggior parte delle preparazioni commerciali) in acqua per 30-60 secondi. Variazioni a questo protocollo includono l'immersione associata a multi-puntura per favorire la penetrazione degli antigeni a livello percutaneo (Nakanishi et al., 2002) e la pre-immersione iperosmotica in soluzione salina, metodo sviluppato inizialmente negli anni '70 (Antipa & Amend, 1977) e in seguito abbandonato in quanto stressante. La somministrazione per immersione garantisce l'uptake antigenico a livello cutaneo, branchiale ed intestinale (acqua ingerita) e determina generalmente una risposta immunitaria localizzata al MALT (produzione mucosale di IgT). La somministrazione orale mediante l'alimento presenta alcune limitazioni sostanziali legate alla scarsa protezione per mancanza di risposta anticorpale sierica, stabilità dell'antigene all'inattivazione gastrica e alla variabilità della dose assunta. L'applicazione sperimentale di tecniche di microincapsulazione degli antigeni ha permesso in parte di aumentare la stimolazione del GALT, ma attualmente l'utilizzo delle formulazioni orali può essere più ragionevolmente applicato come booster di una precedente vaccinazione per immersione o iniezione IP. L'efficacia vaccinale è determinata dalla sua sicurezza, immunogenicità e grado di protezione indotto.

### 1.6.4 Efficacia Vaccinale RPS

L'efficacia di un vaccino può essere valutata comparando, in una prova sperimentale o di campo, la mortalità rilevata in un determinato periodo di tempo tra un gruppo di esemplari vaccinati ed un gruppo di controllo non vaccinato sottoposti alle medesime condizioni di stabulazione ed alla medesima infezione con un patogeno target.

Il calcolo dell'efficacia vaccinale identificato nella *Relative Percent Survival* (RPS) si basa sulla formula proposta in (Amend, 1981):

$$RPS = \left[ 1 - \frac{\%morti\_gruppo\_vaccinato}{\%morti\_gruppo\_non\_vaccinato} \right] \times 100$$

Alcuni dei criteri di base per l'applicazione del metodo sono: una percentuale di mortalità nel gruppo di controllo superiore al 60%, con tempistica simile a quella dell'infezione naturale, l'identificazione del patogeno target negli esemplari giunti a morte ed una percentuale di mortalità aspecifica inferiore al 10% in ciascun gruppo. Nell'European Pharmacopoeia "Vibriosis vaccine (inactivated) for salmonids" (monografia 1581) le linee guida per il licensing dei vaccini stabiliscono che l'efficacia vaccinale per le vibriosi nel caso di somministrazione IP è ritenuta tale nel momento in cui  $RPS > 75\%$ ; mentre nel caso di somministrazione per immersione l'RPS deve superare il 60%.

#### 1.6.5 Vaccinazione contro *V. anguillarum* in branzino

I protocolli vaccinali sviluppati nei confronti del congenere *V. anguillarum* sono generalmente basati sulla somministrazione di semplice bacterin, in grado di elicitarne una efficiente risposta protettiva sia per immersione che per inoculo IP. Tale risposta appare tuttavia molto specifica e limitata al sierogruppo di *V. anguillarum* incluso nella preparazione vaccinale, non evidenziando cross-protezione. Considerando che i sierogruppi di *V. anguillarum* riconosciuti come patogeni nelle specie allevate sono molteplici: O1, O2 (O2a, O2b, O2c, O2d) e O3a, risulta importante, almeno in linea teorica, includere nel bacterin il maggior numero di sierogruppi patogeni per la specie a cui la vaccinazione è rivolta (vaccino polivalente) (Mikkelsen et al., 2004). Numerosi studi hanno evidenziato come gli antigeni più immunogeni e proteggenti siano lipopolisaccardi della membrana cellulare (LPS, 100 kd) stabili al calore (100-120°C) variabili in base al sierogruppo, e due proteine di membrana (49-51 kd) termolabili (Chart & Trust, 1984). Tali lipopolisaccardi ed altre proteine (proteasi, emolisine, eso-emoagglutinine, citotossine e dermatotossine) possono essere escrete nel medium extracellulare dalle cellule batteriche in coltura e costituiscono i cosiddetti prodotti extracellulari (ECP). Questi ECP presentano elevata tossicità se somministrati tal quali ai pesci ( $DL_{50}$ : 4,5-7,3 µg/g p.v.) (Santos et al., 1991a), tuttavia se inattivati termicamente (100°C per 30 minuti) e/o mediante formalina ed associati al semplice bacterin ne incrementano sensibilmente l'efficacia immunizzante (Santos et al., 1991b). Il protocollo vaccinale applicato generalmente in branzino nei confronti di *V. anguillarum* negli allevamenti del Mediterraneo prevede l'immunizzazione per immersione in avannotteria ad una taglia compresa tra 1 e 8 grammi o inoculo IP (> 10 g) e una successiva vaccinazione *booster* mediante inoculo IP durante il *grow-out* se è richiesta una protezione vaccinale superiore ai 10-12 mesi. I sierogruppi inclusi nelle preparazioni commerciali delle principali

aziende farmaceutiche (MSD, Novartis, Pharmaq, Fatro, Hipra) comprendono *V. anguillarum* O1, *V. ordalii* e/o *V. anguillarum* O2a (Haenen et al., 2014).

#### 1.6.6 Vaccinazione contro *V. harveyi*

Prove di efficacia vaccinale contro *V. harveyi* sono state pubblicate a partire dal 2005 in diverse specie d'acquacoltura applicando differenti tipologie vaccinali. Colture batteriche inattivate mediante formalina e somministrate come bacterin in inoculo IP addizionate con adiuvante (Montanide™ ISA 763 AVG) sono state valutate in *E. coioides* mediante infezione con ceppo omologo ed eterologo al ceppo vaccinale 6 settimane post vaccinazione ottenendo RPS elevati (100% ceppo omologo, 89% ceppo eterologo) (Nguyen et al., 2017). Un vaccino inattivato con formalina non adiuvato somministrato IP ( $1,9 \times 10^6$  ufc/eseplare) è stato applicato efficacemente in *Seriola dumerili* ( $80 \pm 20$ g) infettata con ceppo omologo di *V. harveyi* ( $2,5 \times 10^5$  ufc/eseplare) ottenendo RPS del 74% (Minami et al., 2016). Vaccinazione in *Solea senegalensis* effettuata mediante inoculo IP di un ceppo di *V. harveyi* inattivato con formalina arricchito da estratto extracellulare ( $1 \times 10^9$  ufc/eseplare) ha ottenuto un RPS del 80% in infezione IP con ceppo omologo ( $7 \times 10^4$  ufc/grammo p.v.) effettuata 4 settimane post vaccinazione. L'applicazione del medesimo vaccino in esemplari di sogliola (5-10 g) mediante immersione breve (2 minuti,  $1 \times 10^9$  ufc/ml) e prolungata (2 ore,  $2 \times 10^7$  ufc/ml) ha evidenziato RPS inferiori, 22% e 52% rispettivamente, dopo challenge IP con ceppo omologo (Arijo et al., 2005). Un vaccino vivo attenuato prodotto per selezione di mutanti *V. harveyi* resistenti alla rifampicina è stato somministrato in *Paralichthys olivaceus* mediante immersione (1 ora,  $1 \times 10^8$  ufc/ml; richiamo booster dopo 30 giorni), ed ha evidenziato protezione contro *V. harveyi* e cross-protezione per *V. alginolyticus*, somministrati IP dopo 30 e 60 giorni dalla II vaccinazione, con RPS rispettivamente di 73 - 93% (*V. harveyi*) e 56 - 72% (*V. alginolyticus*) (Hu et al., 2012). Un vaccino a DNA è stato sviluppato in *Paralichthys olivaceus* somministrando IM un plasmide bivalente contenente sequenze codificanti per immunogeni, serin proteasi (DegQ<sub>Vh</sub>) e proteina di membrana (Vhp1) di *V. harveyi*, in grado di determinare RPS del 84,6% dopo infezione IP ( $1 \times 10^7$  ufc/eseplare) post 4 settimane dalla vaccinazione (Hu & Sun, 2011). Lo stesso immunogeno DegQ<sub>Vh</sub> è stato applicato come vaccino a subunità, espresso in *E. coli* ingegnerizzati, e somministrato IP in *P. olivaceus* ottenendo RPS del 64,9% a seguito di infezione IP (Zhang et al., 2008). Similmente l'espressione in *E. coli* della proteina di membrana esterna OmpK di *V. harveyi* utilizzata in *E. coioides* come vaccino a sub-unità, adiuvato con composto incompleto di Freund, ha determinato RPS del 100% in infezione per immersione ( $1 \times 10^8$  ufc/ml) (Ningqiu et al., 2008). L'espressione di emolisine (HL1) di *V. harveyi* sulla superficie esterna di lievito *Saccharomyces cerevisiae* e la somministrazione IP di cellule vive di lievito ricombinante (ripetuta settimanalmente per 4-8 settimane) ha evidenziato un certo grado di protezione in *Scophthalmus* sp. ed assente risposta in *P. olivaceus* nei confronti di infezione IP ( $6 \times 10^8$  ufc/eseplare) (Zhu et al., 2006). Attualmente non risultano pubblicati studi di efficacia vaccinale

contro *V. harveyi* in branzino e parimenti non sono stati registrati vaccini contro *V. harveyi* in Europa e Nord America. L'utilizzo di vaccini stabulogeni bivalenti somministrati per bagno e per inoculo IP durante l'accrescimento in avannotteria è routinariamente applicato presso alcune aziende in Francia (Le Breton, comunicazione personale) ed in Spagna (Calvo Fernandez, comunicazione personale).

## 1.7 Valutazione della risposta immunitaria umorale

Prove vaccinali condotte contro numerose specie batteriche in diverse specie di pesci hanno evidenziato come la vaccinazione mediante inoculo induca generalmente un aumento della risposta umorale nei confronti del patogeno somministrato, rilevabile dall'incremento di immunoglobuline sieriche IgM, sebbene l'associazione tra risposta immunitaria ed effettiva protezione (riduzione della mortalità) non sia sempre proporzionale.

L'affidabilità dei metodi sierologici dipende perciò dalla correlazione tra la determinazione degli anticorpi circolanti e l'effettiva protezione osservabile mediante prove di efficacia vaccinale e calcolo dell'RPS. La possibilità di evidenziare e quantificare nel siero la presenza di immunoglobuline IgM specifiche nei confronti di antigeni del patogeno target consente di valutare molteplici aspetti: comparare l'immunogenicità di preparazioni vaccinali; stabilire la persistenza della copertura vaccinale nel tempo; evidenziare la circolazione del patogeno in una popolazione, riscontrando le sierconversioni dovute ad infezione naturale. Tra i metodi applicati nei pesci per la valutazione della risposta immunitaria specifica nei confronti di patogeni batterici o virali la micro-agglutinazione in piastra ed i sistemi immuno-enzimatici hanno un ruolo predominante. In particolare il metodo più frequentemente applicato per robustezza, sensibilità, riproducibilità e possibilità di automazione (screening su larga scala) è il metodo ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). Nella metodica classica (indiretta) l'antigene o aptene in quantità nota (proteina, cellula batterica o virus) è adsorbito passivamente, mediante legame fisico aspecifico di natura elettrostatica, ad una fase solida costituita da pozzetti in polistirene di apposite piastre. Se nel siero in esame, convenientemente diluito, sono presenti anticorpi specifici essi si legheranno all'antigene; l'aggiunta di anti-immunoglobuline contro la specie in esame coniugate con enzima (perossidasi o fosfatasi alcalina) determinerà la formazione di immunocomplessi rilevabili in seguito all'aggiunta di un substrato cromogeno incolore come TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine) o OPD (O-Phenylenediamine dihydrochloride). La reazione enzimatica determinerà una reazione colorimetrica quantificabile mediante lettura spettrofotometrica (densità ottica). Comparando la reazione immunoenzimatica tra siero presumibilmente negativo (esemplari della stessa specie non esposti al patogeno target) e siero incognito alla medesima diluizione (>1:50) è possibile considerare il siero come positivo in presenza di densità ottica pari ad almeno il doppio di quella del campione negativo. La diluizione progressiva del siero in esame permette di determinare il titolo anticorpale considerato come la massima diluizione del siero per cui si evidenzia un risultato positivo.

## 2 MATERIALI E METODI

### 2.1 BATTERIOLOGIA

#### 2.1.1 Collezione di *Vibrio* spp.

Una collezione di 51 isolati di *Vibrio harveyi* è stata costituita grazie all'apporto di ceppi isolati in episodi di mortalità da specie ittiche allevate (*D. labrax*, *S. aurata*) e ornamentali a partire dal 2008 conservati presso la ceppoteca dell'Unità di Ittiopatologia del Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie dell'Università di Bologna (37 isolati) e del Centro Specialistico Ittico dell'Istituto Zooprofilattico sperimentale delle Venezie (IZSVe) (14 isolati). 38 nuovi ceppi di *V. harveyi* sono stati ottenuti mediante l'attività diagnostica routinaria da specie ittiche allevate ed ornamentali, molluschi e crostacei nel quinquennio 2014-2018 presso IZSVe. 3 ceppi di *V. harveyi* isolati in episodi di mortalità in *D. labrax* sono stati conferiti da Hellenic Centre for Marine Research – Creta. Ceppi di referenza di *V. harveyi* (CECT 4215 - LMG 4044) e di Vibrionaceae appartenenti al clade *Harveyi* secondo (Sawabe et al., 2013), quali *V. rotiferianus*, *V. owensii*, *V. campbelli*, *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. natriegens*, *V. mytili* sono state comprese nella collezione assieme a ceppi di referenza di specie causa di patologia in branzino (*Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, *P. damsela* subsp. *damsela*, *V. anguillarum* O1-O2-O6, *V. ordalii*, *V. scophthalmi*) e specie isolate in ambiente marino con caratteristiche fenotipiche simili (*V. vulnificus*, *V. diabolicus*, *V. metschnikovii*, *V. cholerae*, *V. gigantis*, *V. xuii*). Alcuni ceppi di campo di specie ascritte al clade *Harveyi* sono stati compresi successivamente nella ceppoteca. L'elenco completo degli isolati è dettagliato nella seguente Tabella 4.

CEPPO	SPECIE BATTERICA	CODICE IZSVe	CODICE UNIBO	OSPITE	LOCALITA'	ALLEVAMENTO	ORGANO DI ISOLAMENTO
1	<i>Vibrio harveyi</i>	144/ITT/06		<i>Dicentrarchus labrax</i>	Mar Adriatico	-	rene
2	<i>Vibrio harveyi</i>	152/ITT/06.2		<i>Dicentrarchus labrax</i>	Mar Adriatico	-	rene
3	<i>Vibrio harveyi</i>	194/ITT/06.2		<i>Dicentrarchus labrax</i>	Mar Adriatico	-	rene
4	<i>Vibrio harveyi</i>	209/ITT/07.1		<i>Dicentrarchus labrax</i>	Mar Adriatico	-	rene
5	<i>Vibrio harveyi</i>	180/ITT/08		<i>Dicentrarchus labrax</i>	Mar Adriatico	estensivo - valle	rene cefalico
6	<i>Vibrio harveyi</i>	202/ITT/08 . 1		<i>Dicentrarchus labrax</i>	Mar Adriatico	estensivo - valle	rene cefalico
7	<i>Vibrio harveyi</i>	212/ITT/09 . 2		<i>Dicentrarchus labrax</i>	Mar Adriatico	estensivo - valle	rene cefalico
8	<i>Vibrio harveyi</i>	5/ITT/10 . 1		<i>Dicentrarchus labrax</i>	Mar Ionio	Gabbie	cervello
9	<i>Vibrio harveyi</i>	30/ITT/14.1	180/2012 C	<i>Dicentrarchus labrax</i>	Mar Tirreno	Raceway a terra	-
10	<i>Vibrio harveyi</i>	30/ITT/14.2	209/2011 B	<i>Dicentrarchus labrax</i>	Mar Tirreno	Raceway a terra	cervello
11	<i>Vibrio harveyi</i>	30/ITT/14.3	138/2012 A	<i>Dicentrarchus labrax</i>	Mar Tirreno	Raceway a terra	-
12	<i>Vibrio harveyi</i>	30/ITT/14.4	159/2010	<i>Dicentrarchus labrax</i>	Mar Adriatico	Avanotteria	cute
13	<i>Vibrio harveyi</i>	30/ITT/14.5	180/2012 B	<i>Dicentrarchus labrax</i>	Mar Tirreno	Raceway a terra	-
14	<i>Vibrio harveyi</i>	30/ITT/14.6	175/2012 A	<i>Sciaena umbra</i>	Mar Adriatico	Gabbie sottocosta	-
15	<i>Vibrio harveyi</i>	30/ITT/14.7	173/2013	<i>Dicentrarchus labrax</i>	Canale di Sicilia	Gabbie sottocosta	-
16	<i>Vibrio harveyi</i>	30/ITT/14.8	217/2013	-	-	-	cervello
17	<i>Vibrio harveyi</i>	30/ITT/14.9	381/2013	<i>Dicentrarchus labrax</i>	Mar Tirreno	Raceway a terra	cervello
18	<i>Vibrio harveyi</i>	30/ITT/14.10	275/2013	<i>Dicentrarchus labrax</i>	Mar Tirreno	Gabbie sottocosta	cervello
19	<i>Vibrio harveyi</i>	30/ITT/14.11	348/2013 B	<i>Dicentrarchus labrax</i>	Mar Ligure	Gabbie sottocosta	-
20	<i>Vibrio harveyi</i>	30/ITT/14.12	348/2013 C	-	-	-	-
21	<i>Vibrio harveyi</i>	30/ITT/14.13	123/2011 B	<i>Dicentrarchus labrax</i>	Mar Tirreno	Raceway a terra	cervello
22	<i>Vibrio harveyi</i>	30/ITT/14.14	176/2012	<i>Dicentrarchus labrax</i>	Mar Ligure	Gabbie	occhio
23	<i>Vibrio harveyi</i>	30/ITT/14.15	212/2013	<i>Sparus aurata</i>	Mar Ligure	Raceway a terra	cervello
24	<i>Vibrio harveyi</i>	30/ITT/14.16	112/2011 B	<i>Dicentrarchus labrax</i>	Mar Adriatico	Raceway a terra	cervello
25	<i>Vibrio harveyi</i>	30/ITT/14.17	280/2013 B	-	-	-	cervello
26	<i>Vibrio harveyi</i>	30/ITT/14.18	311/2013 B	<i>Dicentrarchus labrax</i>	Mar Tirreno	Gabbie sottocosta	lesione
27	<i>Vibrio harveyi</i>	30/ITT/14.19	138/2012 B	<i>Dicentrarchus labrax</i>	Mar Tirreno	Raceway a terra	cervello
28	<i>Vibrio harveyi</i>	30/ITT/14.20	274/2013	<i>Dicentrarchus labrax</i>	Mar Ligure	Raceway a terra	cervello
29	<i>Vibrio harveyi</i>	179/ITT/14.2		<i>Dicentrarchus labrax</i>	Mar Tirreno	Raceway a terra	-
30	<i>Vibrio harveyi</i>	207/ITT/14.1		<i>Dicentrarchus labrax</i>	Mar Tirreno	Gabbie sottocosta	cervello
31	<i>Vibrio harveyi</i>	207/ITT/14.2		<i>Dicentrarchus labrax</i>	Mar Tirreno	Gabbie sottocosta	rene
32	<i>Vibrio harveyi</i>	207/ITT/14.5		<i>Dicentrarchus labrax</i>	Mar Tirreno	Gabbie sottocosta	cervello
33	<i>Vibrio harveyi</i>	247/ITT/14.1		<i>Dicentrarchus labrax</i>	Mar Ligure	Gabbie sottocosta	cervello
34	<i>Vibrio harveyi</i>	247/ITT/14.4		<i>Dicentrarchus labrax</i>	Mar Ligure	Gabbie sottocosta	rene
35	<i>Vibrio harveyi</i>	210/ITT/09.1		<i>Mugil cephalus</i>	Mar Adriatico	estensivo - valle	milza
36	<i>Vibrio harveyi</i>	208/ITT/12 . 1		<i>Henicocus acuminatus</i>	Acquario pubblico	-	rene - cervello
37	<i>Vibrio harveyi</i>	204/ITT/13 . 1		<i>Dicentrarchus labrax</i>	Mar Tirreno	Raceway a terra	-
38	<i>Vibrio harveyi</i>	317/ITT/13.1		<i>Anguilla anguilla</i>	Mar Adriatico	estensivo - valle	cervello
39	<i>Vibrio harveyi</i>	523/ITT/13 . 1		<i>Dicentrarchus labrax</i>	Mar Tirreno	Raceway a terra	-
40	<i>Vibrio harveyi</i>	625/ITT/13 . 3		<i>Pseudoanthias squamipinnis</i>	Acquario pubblico	-	rene
41	<i>Vibrio harveyi</i>	29/ITT/14.1		<i>Dicentrarchus labrax</i>	Mar Tirreno	Raceway a terra	-
42	<i>Vibrio harveyi</i>	10/ITT/15 . 1		<i>Pterois volitans</i>	Acquario pubblico	Sea Life Jesolo	ulcere cutanee - rene
43	<i>Vibrio harveyi</i>	14/ITT/15 . 1		<i>Apolemichthys xanthurus</i>	Acquario privato	-	occhio
44	<i>Vibrio harveyi</i>	14/ITT/15 . 4		<i>Apolemichthys xanthurus</i>	Acquario privato	-	rene
45	<i>Vibrio harveyi</i>	55/ITT/15.1	430/2014	<i>Ginglymostoma cirratum</i>	Acquario pubblico	-	fegato
46	<i>Vibrio harveyi</i>	55/ITT/15.2	276/2010	<i>Hippocampus sp.</i>	Acquario pubblico	-	-
47	<i>Vibrio harveyi</i>	55/ITT/15.3	281/2014 B	<i>Dicentrarchus labrax</i>	Mar Adriatico orientale	Gabbie sottocosta	-
48	<i>Vibrio harveyi</i>	55/ITT/15.4	308/2014	<i>Dicentrarchus labrax</i>	Mar Adriatico	Gabbie sottocosta	-
49	<i>Vibrio harveyi</i>	55/ITT/15.5	471/2014	<i>Dicentrarchus labrax</i>	-	-	-
50	<i>Vibrio harveyi</i>	55/ITT/15.6	15/2012	<i>Carcharinus plumbeus</i>	Acquario pubblico	-	-
51	<i>Vibrio harveyi</i>	55/ITT/15.7	2/2015 C	<i>Dicentrarchus labrax</i>	Mar Adriatico	Raceway a terra	-
52	<i>Vibrio harveyi</i>	55/ITT/15.8	259/2014 A	<i>Dicentrarchus labrax</i>	Mar Ionio	Gabbie sottocosta	-
53	<i>Vibrio harveyi</i>	55/ITT/15.9	145/2012 A	<i>Carcharinus melanopterus</i>	Acquario pubblico	-	-
54	<i>Vibrio harveyi</i>	55/ITT/15.10	279/2008 A	<i>Sphyrna tiburo</i>	Acquario pubblico	-	-
55	<i>Vibrio harveyi</i>	55/ITT/15.11	352/2014	-	Mar Adriatico	estensivo - valle	milza
56	<i>Vibrio harveyi</i>	55/ITT/15.12	92/2014	<i>Dicentrarchus labrax</i>	Mar Tirreno	Raceway a terra	cervello
57	<i>Vibrio harveyi</i>	55/ITT/15.13	392/2014	<i>Sparus aurata</i>	Mar Ligure	Gabbie sottocosta	-
58	<i>Vibrio harveyi</i>	55/ITT/15.14	314/2009	<i>Muraena sp.</i>	Acquario pubblico	-	-
59	<i>Vibrio harveyi</i>	55/ITT/15.15	235/2014	<i>Sparus aurata</i>	Mar Adriatico	Gabbie sottocosta	-
60	<i>Vibrio harveyi</i>	55/ITT/15.16	279/2014 B	<i>Dicentrarchus labrax</i>	Mar Tirreno	Raceway a terra	-
61	<i>Vibrio harveyi</i>	55/ITT/15.17	374/2014 B	<i>Dicentrarchus labrax</i>	Canale di Sicilia	Gabbie sottocosta	cervello
62	<i>Vibrio harveyi</i>	110 /ITT/15.1		<i>Dicentrarchus labrax</i>	Mar Egeo - Creta	Gabbie	-
63	<i>Vibrio harveyi</i>	110 /ITT/15.2		<i>Dicentrarchus labrax</i>	Mar Egeo - Creta	Gabbie	-
64	<i>Vibrio harveyi</i>	110 /ITT/15.3		<i>Dicentrarchus labrax</i>	Mar Egeo - Creta	Gabbie	-
65	<i>Vibrio harveyi</i>	231/ITT/15.1		<i>Sparus aurata</i>	-	-	milza
66	<i>Vibrio harveyi</i>	231/ITT/15.3		<i>Sparus aurata</i>	-	-	milza
67	<i>Vibrio harveyi</i>	26/ITT/16.11		<i>Dicentrarchus labrax</i>	Turchia	Avanotteria	cute
68	<i>Vibrio harveyi</i>	26/ITT/16.14		<i>Dicentrarchus labrax</i>	Turchia	Avanotteria	cute
69	<i>Vibrio harveyi</i>	59/ITT/16.3		<i>Caesio cunning</i>	Acquario pubblico	-	cute
70	<i>Vibrio harveyi</i>	96/ITT/16.24		<i>Acqua marina</i>	Acquario pubblico	-	-
71	<i>Vibrio harveyi</i>	106/ITT/16.19		<i>Acqua marina</i>	Acquario pubblico	-	-
72	<i>Vibrio harveyi</i>	181/ITT/16.10		<i>Litopenaeus vannamei</i>	Allevamento RAS	-	muscolo
73	<i>Vibrio harveyi</i>	300/ITT/16.1		<i>Sparus aurata</i>	Mar Tirreno	-	cute
74	<i>Vibrio harveyi</i>	300/ITT/16.2		<i>Sparus aurata</i>	Mar Tirreno	-	cute
75	<i>Vibrio harveyi</i>	332/ITT/16.1		<i>Lutjanus kasmika</i>	Acquario pubblico	-	rene
76	<i>Vibrio harveyi</i>	10/ITT/17.1		<i>Chromis analis</i>	Acquario pubblico	-	rene
77	<i>Vibrio harveyi</i>	200/ITT/17.4		<i>Dicentrarchus labrax</i>	Mar Tirreno	Gabbie sottocosta	cervello
78	<i>Vibrio harveyi</i>	220/ITT/17.2		<i>Sparus aurata</i>	Mar Tirreno	-	rene
79	<i>Vibrio harveyi</i>	222/ITT/17.3		<i>Dicentrarchus labrax</i>	Acquario sperimentale	-	milza
80	<i>Vibrio harveyi</i>	421/ITT/17.1		<i>Dicentrarchus labrax</i>	Mar Mediterraneo - Malta	-	rene cefalico
81	<i>Vibrio harveyi</i>	136/ITT/15.20		<i>Crassostrea gigas</i>	Mar Adriatico	Laguna	pool organi
82	<i>Vibrio harveyi</i>	200/ITT/15.14		<i>Ruditapes philippinarum</i>	Mar Adriatico	Laguna	pool organi
83	<i>Vibrio harveyi</i>	200/ITT/15.15		<i>Ruditapes philippinarum</i>	Mar Adriatico	Laguna	pool organi
84	<i>Vibrio harveyi</i>	236/ITT/17.2		<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Mar Adriatico	Laguna	pool organi
85	<i>Vibrio harveyi</i>	326/ITT/17.2		<i>Ruditapes philippinarum</i>	Mar Adriatico	Laguna	pool organi
86	<i>Vibrio harveyi</i>	33/ITT/18.16		<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Mar Ligure	-	pool organi
87	<i>Vibrio harveyi</i>	33/ITT/18.21		<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Mar Ligure	-	pool organi
88	<i>Vibrio harveyi</i>	33/ITT/18.26		<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Mar Ligure	-	pool organi
89	<i>Vibrio harveyi</i>	33/ITT/18.27		<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Mar Ligure	-	pool organi

CEPPO	SPECIE BATTERICA	CODICE IZSVe	OSPITE	LOCALITA'	ALLEVAMENTO	ORGANO DI ISOLAMENTO
90	<i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> ATCC17911	R27	<i>Roccus americanus</i>	-	-	-
91	<i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i> NCIMB 13351	R52	<i>Labracoglossa argentiiventris</i>	-	-	-
92	<i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i> NCIMB 2182	R53	<i>Homo sapiens</i>	-	-	-
93	<i>Vibrio alginolyticus</i> LMG 4409	R26	<i>Trachurus japonicus</i>	-	-	-
94	<i>Vibrio anguillarum</i> O1 LMG 10861	R13	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	-	-	-
95	<i>Vibrio anguillarum</i> O2 LMG 10862	R14	<i>Gadus morhua</i>	-	-	-
96	<i>Vibrio anguillarum</i> O6 LMG 10866	R18	<i>Gadus morhua</i>	-	-	-
97	<i>Vibrio campbellii</i> CECT 523	R64	<i>Acqua marina</i>	-	-	-
98	<i>Vibrio cholerae</i> ATCC 25872	R152	<i>Homo sapiens</i>	-	-	-
99	<i>Vibrio diabolicus</i> LMG 23867	R8	<i>Acqua marina</i>	-	-	-
100	<i>Vibrio gigantis</i> DSMZ 18531	R183	<i>Crassostrea gigas</i>	-	-	-
101	<i>Vibrio harveyi</i> CECT 4215	R189	<i>Carcharhinus plumbeus</i>	-	-	-
102	<i>Vibrio harveyi</i> LMG 4044	R24	<i>Talorchestia</i> sp.	-	-	-
103	<i>Vibrio metschnikovii</i> CECT 5070	R190	-	-	-	-
104	<i>Vibrio mytili</i> CECT 632	R187	<i>Mytilus edulis</i>	-	-	-
105	<i>Vibrio natriegens</i> CECT 526	R185	<i>Sedimento</i>	-	-	-
106	<i>Vibrio neptunius</i> DSMZ 17183	R180	<i>Nodipecten nodosus</i>	-	-	-
107	<i>Vibrio ordalii</i> CECT 582	R186	<i>Oncorhynchus kisutch</i>	-	-	-
108	<i>Vibrio orientalis</i> CECT629	R155	<i>Acqua marina</i>	-	-	-
109	<i>Vibrio owensii</i> LMG 25443	R9	<i>Panulirus ornatus</i>	-	-	-
110	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> ATCC 17802	R43	<i>Homo sapiens</i>	-	-	-
111	<i>Vibrio rotiferianus</i> LMG 21460	R11	-	-	-	-
112	<i>Vibrio scophthalmi</i> DSMZ 19140	R177	<i>Scophthalmus maximus</i>	-	-	-
113	<i>Vibrio vulnificus</i> ATCC27562	R45	<i>Homo sapiens</i>	-	-	-
114	<i>Vibrio xuii</i> DSMZ17185	R181	<i>Acqua marina</i>	-	-	-
115	<i>Vibrio alginolyticus</i>	145/ITT/15.3	<i>Micropterus salmoides</i>	Acque interne		rene
116	<i>Vibrio alginolyticus</i>	200/ITT/15.18	<i>Ruditapes philippinarum</i>	Mar Adriatico		pool organi
117	<i>Vibrio orientalis</i>	202/ITT/15.5	<i>Dicentrarchus labrax</i>			avannotti
118	<i>Vibrio rotiferianus</i>	326/ITT/17.6	<i>Ruditapes philippinarum</i>	Mar Adriatico		pool organi
119	<i>Vibrio rotiferianus</i>	211/ITT/15.2	<i>Sparus aurata</i>			milza
120	<i>Vibrio rotiferianus</i>	228/ITT/15.3	<i>Dicentrarchus labrax</i>			cute
121	<i>Vibrio rotiferianus</i>	200/ITT/15.19	<i>Ruditapes philippinarum</i>	Mar Adriatico		pool organi
122	<i>Vibrio vulnificus</i>	14/ITT/15.3	<i>Apolemichthys xanthurus</i>	Acquario privato		cute

**Tabella 4:** Elenco dei ceppi inclusi nella collezione. *Vibrio harveyi* isolati in specie ittiche (80) ed in molluschi bivalvi (9); ceppi di referenza di altre specie della famiglia Vibrionaceae (24) ed alcuni ceppi di campo (8) appartenenti o meno al clade *Harveyi*.

### 2.1.1.1 Crescita e stoccaggio a breve e lungo termine

I ceppi batterici di campo sono stati conferiti al laboratorio IZSVe in crescita attiva su TSA o congelati in provette contenenti criopreservante (glicerolo). I ceppi di referenza (ceppoteca IZSVe) sono stati riattivati a partire da provette stoccate a  $-80 \pm 5^\circ\text{C}$ . Ciascun ceppo batterico è stato inizialmente strisciato con anse sterili su piastre di AS ed incubato overnight in incubatore a  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ . In presenza di colonie con morfologia omogenea, una singola colonia è stata selezionata e subcoltivata strisciandola in TSA 2%NaCl ed incubandola a  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  per 24 ore. Ciascun isolato è stato successivamente stoccato in due aliquote in provette cryobank, una stoccata a  $-80 \pm 5^\circ\text{C}$  per la conservazione a lungo termine e un'altra in provetta cryobank a  $-35 \pm 2^\circ\text{C}$  per l'utilizzo routinario. La patina batterica è stata prelevata con ansa monouso dalla piastra (circa 1/3 della superficie) ed è stata stemperata nel medium criopreservante di una provetta Microbank™ (Pro-lab Diagnostics, Canada) contenente perline porose in vetro. Dopo aver invertito più volte la provetta ed atteso 2-5 minuti per favorire l'adesione dei batteri alle perline il medium è stato rimosso e la provetta identificata con codice univoco è stata congelata per 48 ore a  $-35 \pm 2^\circ\text{C}$  e successivamente stoccata a  $-80 \pm 5^\circ\text{C}$ .

## 2.1.2 Identificazione fenotipica di *Vibrio harveyi* e *Vibrio spp.*

Ciascun isolato batterico è stato rivitalizzato in provetta contenente brodo TSB 2% NaCl seminando 2 perline da microbank della collezione mantenuta a  $-35 \pm 2^\circ\text{C}$ . Dopo incubazione overnight a  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  i brodi sono stati strisciati su AS e TSA 2%NaCl per valutare la morfologia delle colonie. I ceppi sono stati osservati per la capacità di produrre emolisi ( $\alpha$  o  $\beta$  emolisi) in AS post 24-48-72 ore di incubazione, determinare colonie sciamanti in TSA 2%, per luminescenza delle colonie coltivate in AS osservate in ambiente buio per 5-10 minuti a 24 ore di incubazione. La morfologia delle cellule batteriche è stata valutata con osservazione microscopica a fresco a contrasto di fase (40-100 $\times$ ). L'identificazione primaria si è basata sui seguenti test: KOH (differenziazione Gram-/+), ossidasi (Bactident® Oxidase, Merk, DE), catalasi ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), crescita su MacConkey agar e test biochimici in macrometodo come il test di ossidazione/fermentazione in terreno (O-F 2% NaCl), la crescita in Klingler's iron agar (KIA 2% NaCl) e in SIM medium per valutare la produzione di  $\text{H}_2\text{S}$ , indolo e motilità. Alcuni ceppi sono stati seminati in Christensen Agar per valutare l'ureasi in macrometodo. I ceppi sono stati incubati in TSA 2% a  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ;  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ;  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  e  $42 \pm 1^\circ\text{C}$  per valutare la crescita a diverse temperature. I ceppi di *V. harveyi* hanno evidenziato una crescita più rapida a  $25^\circ\text{C}$  rispetto ai  $22^\circ\text{C}$ , motivo per cui questa temperatura è stata impiegata successivamente per l'incubazione delle colonie nelle prove biochimiche di seguito descritte.

### 2.1.2.1 Terreni selettivi e differenziali

La crescita e la morfologia dei diversi ceppi sono state valutate su terreno selettivo-differenziale TCBS agar (Difco™) e CHROMagar Vibrio™ (CHROMagar, Paris, FR). La colorazione delle colonie è stata valutata a 24 e 48 ore di incubazione; particolare attenzione è stata posta nella descrizione del CHROMagar Vibrio™ evidenziando la presenza di una o più pigmentazioni in relazione alla densità delle colonie.

### 2.1.2.2 O/129 Vibriostatic test

Una colonia del batterio in esame è stata portata in sospensione in 2 ml di soluzione fisiologica sterile 0,9% NaCl e la sospensione è stata distribuita uniformemente con tampone sterile imbibito su una piastra di TSA 2% NaCl. Successivamente sono stati posti con pinzette sterili monouso dischetti contenenti rispettivamente 10  $\mu\text{g}$  e 150  $\mu\text{g}$  di 2,4-diamino-6,7diisopropylpteridina (Oxoid Ltd., Basingstoke, UK). La piastra è stata incubata overnight a  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  ( $25^\circ\text{C}$  per *V. harveyi*) ed è stato misurato il diametro dell'alone di inibizione di crescita. Un alone di 9 mm di diametro o superiore attorno al disco di 150  $\mu\text{g}$  e qualsiasi alone di inibizione attorno al disco da 10  $\mu\text{g}$  sono stati considerati come sensibilità al test O/129.



### 2.1.2.3 API20E

Il test a galleria miniaturizzato API<sup>®</sup>20E<sup>™</sup>, utilizzato tipicamente nell'identificazione di routine di enterobatteri e batteri Gram negativi non esigenti, comprende 21 test biochimici e si basa sul viraggio cromatico dei terreni (spontaneo o per aggiunta di reattivi) a seguito del metabolismo amminoacidico e alla fermentazione degli zuccheri. Il test è stato effettuato seguendo le indicazioni della ditta produttrice (bioMérieux SA, FR) con alcuni adattamenti. In particolare trattandosi di specie alofile è stata utilizzata una soluzione salina 2% NaCl per ottenere la sospensione del batterio in esame e l'incubazione è stata effettuata a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  per *V. harveyi* e  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  per gli altri *Vibrio*. La lettura della galleria è stata effettuata a 24, 48 e 72 ore di incubazione. I risultati sono stati riportati nell'apposito modulo ottenendo un profilo numerico a 7 cifre per ciascun ceppo in esame. I profili numerici ottenuti sono stati confrontati con il database specifico per le specie batteriche ittiche riportato nel manuale edito da Buller (2014) e secondariamente con il software di identificazione Apiweb<sup>™</sup>.

### 2.1.3 Identificazione biomolecolare

L'analisi molecolare dei ceppi batterici è stata svolta con due finalità: primariamente per confermare l'identificazione degli isolati a livello di specie attraverso la comparazione di sequenze di geni costitutivamente espressi con le sequenze in letteratura; secondariamente per identificare in maniera rapida, economica e specifica isolati appartenenti alla specie *V. harveyi*. A questo scopo sono stati applicati due protocolli PCR. L'amplificazione di una porzione del gene *housekeeping pyrH*, codificante per l'uridina monofosfato chinasi, normalmente presente nella famiglia *Vibrionaceae* è stata ottenuta mediante PCR end-point seguita da sequenziamento. La sequenza ottenuta per ciascun isolato della collezione è stata comparata con le sequenze presenti nel database pubblico GenBank<sup>®</sup> e successivamente è stata condotta un'analisi filogenetica per verificare la clusterizzazione coerente degli isolati di campo con i ceppi di riferimento. Una PCR end-point specie specifica per *V. harveyi* senza necessità di sequenziamento è stata standardizzata a partire da protocolli pubblicati sulla regione ipervariabile del gene *toxR* (Pang et al., 2006).

#### 2.1.3.1 Estrazione del DNA batterico

Si è proceduto all'estrazione del DNA genomico totale a partire da colonie batteriche incubate per 18-24 ore in AS a  $22^\circ\text{C}$  -  $25^\circ\text{C}$  utilizzando il kit di estrazione commerciale a colonnina QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, DE) seguendo le istruzioni indicate dal produttore. In particolare per ciascun ceppo un'ansata di patina batterica è stata prelevata ed emulsionata in buffer di lisi contenente proteinasi K mantenuto in agitazione (600 rpm) overnight a  $56^\circ\text{C}$ . L'estratto di DNA purificato è stato valutato mediante spettrofotometro NanoDrop Lite (Thermo Scientific, Wilmington, U.S.A.); la

concentrazione di DNA (espressa in ng/ $\mu$ l ) è stata calcolata in base all'assorbanza a 260 nm, mentre la qualità (*ratio* di purezza) dell'estratto è stata determinata dal rapporto tra l'assorbanza a 260 nm e l'assorbanza a 280 nm (*ratio* atteso tra 1,8 e 2,0). Successivamente tutti gli estratti sono stati diluiti per ottenere una concentrazione di DNA standard di 100 ng/ $\mu$ l e stoccati a  $-80 \pm 5^\circ\text{C}$  fino al momento dell'uso.

### 2.1.3.2 Amplificazione del gene *pyrH*

L'amplificazione di una porzione del gene *housekeeping pyrH*, codificante per l'uridina monofosfato chinasi, si è basata sulla coppia di primer pyrH80F 5'- GATCGTATGGCTCAAGAAC-3' e pyrH530R 5'-TAGGCATTTTGTGGTCACG-3' e sul protocollo di amplificazione precedentemente pubblicati (Sawabe et al., 2007; Pascual et al., 2010). Le concentrazioni dei reagenti impiegati nella mix di PCR sono riportate in Tabella 5. In particolare è stata utilizzata una Taq polimerasi (Platinum<sup>®</sup> Taq DNA Polymerase, Invitrogen<sup>™</sup>) associata a buffer e MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen<sup>™</sup>).

Reagente	Concentrazione iniziale	Concentrazione finale	Volume per una reazione
Acqua (MBG)	-	-	34,20 $\mu$ l
Buffer (-MgCl <sub>2</sub> )	10 $\times$	1 $\times$	5 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	1,5 mM	1,5 $\mu$ l
dNTP's	10 mM	0,8 mM	4 $\mu$ l
Primer pyrH80F	10 $\mu$ M	0,4 $\mu$ M	2 $\mu$ l
Primer pyrH530R	10 $\mu$ M	0,4 $\mu$ M	2 $\mu$ l
Taq polimerasi	5 U/ $\mu$ l	1,5 U/ $\mu$ l	0,3 $\mu$ l
Volume mix	-	-	49 $\mu$ l
Volume DNA	-	-	1 $\mu$ l
Volume finale di reazione	-	-	50 $\mu$ l

**Tabella 5:** Condizioni di amplificazione PCR per il gene *pyrH*

Le reazioni di PCR sono state condotte mediante termociclatore GelAmp<sup>®</sup> PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) applicando il profilo termico di amplificazione riportato in Tabella 6. Rispetto al profilo riportato in letteratura la temperatura di annealing è stata modificata e portata a 53 $^\circ\text{C}$  a seguito dei risultati ottenuti da prove comparative.

Profilo termico di amplificazione			
Fase	Temperatura	Tempo	N° Cicli
Attivazione polimerasi	95°C	2 min	1
Denaturazione	95°C	1 min	40
<i>Annealing</i>	53°C	2 min 15 sec	
Estensione	72°C	1 min 15 sec	
Estensione finale	72°C	7 min	1
Refrigerazione	4°C	∞	1

**Tabella 6:** Profilo termico di amplificazione per il gene *pyrH*

La qualità dei prodotti di amplificazione (440 – 520 bp) è stata valutata visualizzando gli amplificati in gel di agarosio all'1% p/V in buffer Tris-Acetato-EDTA (TAE) 1×, con bromuro di etidio (500 µg/ml) tramite corsa elettroforetica a 100 V per 30-45 minuti. I gel sono stati visualizzati mediante trans-illuminatore Geldoc XR+ (Bio-Rad Laboratories Inc., CA, USA) e l'immagine è stata analizzata mediante software Image Lab™ 5.2 (Bio-Rad Laboratories Inc.). Tutti i prodotti di PCR di ceppi batterici che hanno evidenziato la presenza di una banda di dimensioni compatibili sono stati sequenziati mediante sequenziamento Sanger.

Gli amplificati sono stati purificati mediante ExoSAP-IT® (USB Corporation, OH, USA) e sequenziati in entrambe le direzioni utilizzando il kit di sequenziamento Big Dye Terminator v3.1 (Applied Biosystems). Le reazioni di sequenziamento sono state ripurificate in CENTRI-SEP 96 Well Plate (Princeton Separations Inc.) ed analizzate in 16-capillary ABI PRISM 3130XI Genetic Analyzer (Applied Biosystems). I dati di sequenza sono stati assemblati ed editati utilizzando i software Sequencing Analysis 5.2 e SeqScape v2.5 (Applied Biosystems). Le sequenze ottenute sono state confrontate attraverso il software BLAST® (Basic Local Alignment Search Tool) con le sequenze presenti nel database pubblico GenBank® identificando per ciascuna di esse la specie batterica con maggiore omologia di sequenza.

### 2.1.3.3 Amplificazione del gene *toxR* specie-specifico

L'amplificazione del gene *toxR* è stata condotta mediante una coppia di primer *V. harveyi* specie-specifici sviluppati sulla regione ipervariabile del gene *toxR*: toxRF1 5' – GAAGCAGCACTCACCGAT-3' e toxRR1 5'-GGTGAAGACTCATCAGCA-3' (Pang et al., 2006). La dimensione attesa dell'amplificato è di 382 bp. Il protocollo di PCR, riportato in Tabella 7, è stato lievemente modificato rispetto alla pubblicazione per adattarlo alle caratteristiche della Taq polimerasi impiegata (Platinum® Taq DNA Polymerase, Invitrogen™). Il profilo termico di amplificazione

(Tabella 8) è stato modificato rispetto al protocollo pubblicato (Pang et al., 2006). In particolare la temperatura di annealing inizialmente applicata (55°C) è stata modificata a 61°C a seguito di prove comparative in gradiente termico con specie non target appartenenti al clade *Harveyi* (*V. rotiferianus*, *V. owensii*, *V. campbelli*, *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. natriegens*, *V. mytili*) e congeneri fenotipicamente simili (*V. anguillarum* O1-O2, *V. ordalii*, *V. diabolicus*, *V. metschnikovii*, *V. cholerae*, *V. gigantis*, *V. xuii*, *V. scophthalmi*, *V. vulnificus*, *V. orientalis*, *V. mediterranei*, *V. neptunius*, *P. damsela* subsp. *piscicida*, *P. damsela* subsp. *damsela*) al fine di ridurre la presenza di bande aspecifiche. Tutti i ceppi batterici della collezione sono stati sottoposti alla PCR end-point.

I prodotti di amplificazione sono stati sottoposti a corsa elettroforetica a 100 V per 35 minuti in gel di agarosio all'1,5% p/V in buffer Tris-Acetato-EDTA (TAE) 1×, con bromuro di etidio (500 µg/ml). La presenza di una banda di dimensioni opportune (≈ 382 bp) è stata interpretata come risultato positivo per *V. harveyi*.

Reagente	Concentrazione iniziale	Concentrazione finale	Volume per una reazione
Acqua	-	-	34,20 µl
Buffer (-MgCl <sub>2</sub> )	10×	1×	5 µl
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	1,5 mM	1,5 µl
dNTP's	10 mM	0,8 mM	4 µl
Primer toxRF1	10 µM	0,4 µM	2 µl
Primer toxRR1	10 µM	0,4 µM	2 µl
Taq polimerasi	5 U/µl	1,5 U/µl	0,3 µl
Volume mix	-	-	49 µl
Volume DNA	-	-	1 µl
Volume finale di reazione	-	-	50 µl

**Tabella 7:** Condizioni di amplificazione PCR per il gene *toxR*

Profilo termico di amplificazione			
Fase	Temperatura	Tempo	N° Cicli
Attivazione polimerasi	94°C	1 min	1
Denaturazione	94°C	1 min	30
Annealing	61°C	1 min	
Estensione	72°C	1 min	
Estensione finale	72°C	10 min	1
Refrigerazione	4°C	∞	1

**Tabella 8:** Profilo termico di amplificazione per il gene *toxR*

### 2.1.3.4 Analisi filogenetica

Le sequenze del gene *pyrH* ottenute dalla quasi totalità dei ceppi della collezione sono state allineate con software MEGA 5 software (Tamura et al., 2011) e comparate con le sequenze di riferimento disponibili in GenBank® di 25 specie batteriche rappresentative dei principali clade della famiglia Vibrionaceae secondo (Sawabe et al., 2013), come riportato in Tabella 9.

La specie *Aliivibrio fischeri* è stata scelta come outgroup. L'analisi filogenetica è stata condotta mediante il software MEGA 5 applicando il metodo Neighbour-Joining. Per valutare la robustezza dei singoli nodi è stato applicato un valore Bootstrap pari a 10.000.

ACCESSION NUMBER	CODICE IZSVE	SPECIE BATTERICA	OSPITE	CODICE IZSVE	SPECIE BATTERICA	OSPITE
EF415528.1		<i>Aliivibrio fischeri</i> ATCC 33509	-	204/ITT/13.1	<i>Vibrio harveyi</i>	<i>Dicentrarchus labrax</i>
FM202581.1		<i>Vibrio alginolyticus</i> CECT 609	-	317/ITT/13.1	<i>Vibrio harveyi</i>	<i>Anguilla anguilla</i>
FM202579.1		<i>Vibrio alginolyticus</i> CECT 436	-	523/ITT/13.1	<i>Vibrio harveyi</i>	<i>Dicentrarchus labrax</i>
	R26	<i>Vibrio alginolyticus</i> LMG 4409	<i>Trachurus japonicus</i>	625/ITT/13.3	<i>Vibrio harveyi</i>	<i>Pseudanthias squamipinnis</i>
	145/ITT/15.3	<i>Vibrio alginolyticus</i>	<i>Micropterus salmoides</i>	29/ITT/14.1	<i>Vibrio harveyi</i>	<i>Dicentrarchus labrax</i>
	200/ITT/15.18	<i>Vibrio alginolyticus</i>	<i>Ruditapes philippinarum</i>	30/ITT/14.1	<i>Vibrio harveyi</i>	<i>Dicentrarchus labrax</i>
	R14	<i>Vibrio anguillarum</i> O2 LMG 10862	<i>Gadus morhua</i>	30/ITT/14.2	<i>Vibrio harveyi</i>	<i>Dicentrarchus labrax</i>
	R18	<i>Vibrio anguillarum</i> O6 LMG 10866	<i>Gadus morhua</i>	30/ITT/14.3	<i>Vibrio harveyi</i>	<i>Dicentrarchus labrax</i>
AB428902.1		<i>Vibrio azureus</i>	<i>acqua marina</i>	30/ITT/14.4	<i>Vibrio harveyi</i>	<i>Dicentrarchus labrax</i>
FJ752698.1		<i>Vibrio campbellii</i> ATCC 33863	<i>acqua marina</i>	30/ITT/14.5	<i>Vibrio harveyi</i>	<i>Dicentrarchus labrax</i>
EF596640.1		<i>Vibrio campbellii</i> LMG 11256	<i>acqua marina</i>	30/ITT/14.6	<i>Vibrio harveyi</i>	<i>Sciaena umbra</i>
	R64	<i>Vibrio campbellii</i> CECT 523	<i>acqua marina</i>	30/ITT/14.7	<i>Vibrio harveyi</i>	<i>Dicentrarchus labrax</i>
	R152	<i>Vibrio cholerae</i> ATCC 25872	<i>Homo sapiens</i>	30/ITT/14.8	<i>Vibrio harveyi</i>	-
JF739414.1		<i>Vibrio diabolicus</i> CAIM 849	<i>Alvinella pompejana</i>	30/ITT/14.9	<i>Vibrio harveyi</i>	<i>Dicentrarchus labrax</i>
KF899225.1		<i>Vibrio diabolicus</i> LMG 23867	<i>acqua marina</i>	30/ITT/14.10	<i>Vibrio harveyi</i>	<i>Dicentrarchus labrax</i>
KC871682.1		<i>Vibrio diabolicus</i> PEL41D	-	30/ITT/14.11	<i>Vibrio harveyi</i>	<i>Dicentrarchus labrax</i>
	R183	<i>Vibrio gigantis</i> DSMZ 18531	<i>Crassostrea gigas</i>	30/ITT/14.12	<i>Vibrio harveyi</i>	-
EU871951.1		<i>Vibrio gigantis</i> DSM 18531	<i>Crassostrea gigas</i>	30/ITT/14.13	<i>Vibrio harveyi</i>	<i>Dicentrarchus labrax</i>
	R24	<i>V. harveyi</i> LMG 4044	<i>Talorchestia</i> sp.	30/ITT/14.14	<i>Vibrio harveyi</i>	<i>Dicentrarchus labrax</i>
	R189	<i>Vibrio harveyi</i> (carchariae) CECT 4215	<i>Carcharhinus plumbeus</i>	30/ITT/14.15	<i>Vibrio harveyi</i>	<i>Sparus aurata</i>
EU118238.1		<i>Vibrio harveyi</i> ATCC 14126	<i>Talorchestia</i> sp.	30/ITT/14.16	<i>Vibrio harveyi</i>	<i>Dicentrarchus labrax</i>
EF596370.1		<i>Vibrio harveyi</i> (trachuri) LMG 19519	<i>Trachurus japonicus</i>	30/ITT/14.17	<i>Vibrio harveyi</i>	-
EU130515.1		<i>Vibrio harveyi</i> (carchariae) ATCC 35084	<i>Carcharhinus plumbeus</i>	30/ITT/14.18	<i>Vibrio harveyi</i>	<i>Dicentrarchus labrax</i>
AB562600.1		<i>Vibrio jascida</i>	<i>Jasus verreauxi</i>	30/ITT/14.19	<i>Vibrio harveyi</i>	<i>Dicentrarchus labrax</i>
	R88	<i>Vibrio mediterranei</i> CECT 621	Sedimento- Spagna	179/ITT/14.2	<i>Vibrio harveyi</i>	<i>Dicentrarchus labrax</i>
GU266287.1		<i>Vibrio mytili</i> LMG 19157	<i>Mytilus edulis</i>	207/ITT/14.1	<i>Vibrio harveyi</i>	<i>Dicentrarchus labrax</i>
FM999815.1		<i>Vibrio natriegens</i> CECT 7466	<i>acqua marina</i>	207/ITT/14.2	<i>Vibrio harveyi</i>	<i>Dicentrarchus labrax</i>
FM999814.1		<i>Vibrio natriegens</i> CECT 7465	<i>acqua marina</i>	207/ITT/14.5	<i>Vibrio harveyi</i>	<i>Dicentrarchus labrax</i>
	R185	<i>Vibrio natriegens</i> CECT 526	Sedimento	10/ITT/15.1	<i>Vibrio harveyi</i>	<i>Pterois volitans</i>
	R180	<i>Vibrio neptunius</i> DSMZ 17183	<i>Nodipecten nodosus</i>	14/ITT/15.4	<i>Vibrio harveyi</i>	<i>Apolemichthys xanthurus</i>
	202/ITT/15.5	<i>Vibrio orientalis</i>	<i>Dicentrarchus labrax</i>	55/ITT/15.1	<i>Vibrio harveyi</i>	<i>Ginglymostoma cirratum</i>
	R155	<i>Vibrio orientalis</i> CECT629	<i>acqua marina</i>	55/ITT/15.2	<i>Vibrio harveyi</i>	<i>Hippocampus</i> sp.
KU755173.1		<i>Vibrio ordalii</i> ATCC 33509	<i>Oncorhynchus kisutch</i>	55/ITT/15.3	<i>Vibrio harveyi</i>	<i>Dicentrarchus labrax</i>
	R9	<i>Vibrio owensii</i> LMG 25443	<i>Panulirus ornatus</i>	55/ITT/15.4	<i>Vibrio harveyi</i>	<i>Dicentrarchus labrax</i>
KX815342.1		<i>Vibrio owensii</i> NCCB 100454	<i>Penaeus monodon</i>	55/ITT/15.5	<i>Vibrio harveyi</i>	<i>Dicentrarchus labrax</i>
JF739426.1		<i>Vibrio owensii</i> CAIM 1163	-	55/ITT/15.6	<i>Vibrio harveyi</i>	<i>Carcharhinus plumbeus</i>
JF739409.1		<i>Vibrio owensii</i> CAIM 755	-	55/ITT/15.7	<i>Vibrio harveyi</i>	<i>Dicentrarchus labrax</i>
FM202577.1		<i>Vibrio parahaemolyticus</i> CECT 611	-	55/ITT/15.10	<i>Vibrio harveyi</i>	<i>Sphyrna tiburo</i>
KF899229.1		<i>Vibrio parahaemolyticus</i> ATCC 43996	<i>Cerastoderma</i> sp.	55/ITT/15.11	<i>Vibrio harveyi</i>	-
	R43	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> ATCC 17802	<i>Homo sapiens</i>	55/ITT/15.12	<i>Vibrio harveyi</i>	<i>Dicentrarchus labrax</i>
FM202567.1		<i>Vibrio rotiferianus</i> CAIM 576	<i>Brachionus plicatilis</i>	55/ITT/15.13	<i>Vibrio harveyi</i>	<i>Sparus aurata</i>
JF739434.1		<i>Vibrio rotiferianus</i> CAIM 1253	-	55/ITT/15.14	<i>Vibrio harveyi</i>	<i>Muraena</i> sp.
	228/ITT/15.3	<i>Vibrio rotiferianus</i>	<i>Dicentrarchus labrax</i>	55/ITT/15.15	<i>Vibrio harveyi</i>	<i>Sparus aurata</i>
	326/ITT/17.6	<i>Vibrio rotiferianus</i>	<i>Ruditapes philippinarum</i>	55/ITT/15.17	<i>Vibrio harveyi</i>	<i>Dicentrarchus labrax</i>
	211/ITT/15.2	<i>Vibrio rotiferianus</i>	<i>Sparus aurata</i>	110/ITT/15.1	<i>Vibrio harveyi</i>	<i>Dicentrarchus labrax</i>
	R11	<i>Vibrio rotiferianus</i> LMG 21460	-	110/ITT/15.2	<i>Vibrio harveyi</i>	<i>Dicentrarchus labrax</i>
AB428914.1		<i>Vibrio sagamiensis</i>	<i>acqua marina</i>	110/ITT/15.3	<i>Vibrio harveyi</i>	<i>Dicentrarchus labrax</i>
	R177	<i>Vibrio scophthalmi</i> DSMZ 19140	<i>Scophthalmus maximus</i>	136/ITT/15.20	<i>Vibrio harveyi</i>	<i>Crassostrea gigas</i>
	R45	<i>Vibrio vulnificus</i> ATCC 27562	<i>Homo sapiens</i>	200/ITT/15.14	<i>Vibrio harveyi</i>	<i>Ruditapes philippinarum</i>
GQ382227.1		<i>Vibrio vulnificus</i> ATCC 33147	<i>Anguilla</i> sp.	200/ITT/15.15	<i>Vibrio harveyi</i>	<i>Ruditapes philippinarum</i>
	14/ITT/15.3	<i>Vibrio vulnificus</i>	<i>Apolemichthys xanthurus</i>	231/ITT/15.1	<i>Vibrio harveyi</i>	<i>Sparus aurata</i>
	R181	<i>Vibrio xuii</i> DSMZ 17185	<i>acqua marina/peneidi</i>	231/ITT/15.3	<i>Vibrio harveyi</i>	<i>Sparus aurata</i>
GU186353.1		<i>Vibrio xuii</i> ID2	-	59/ITT/16.3	<i>Vibrio harveyi</i>	<i>Caesio cunning</i>
	COD. IZSVE	SPECIE BATTERICA	OSPITE	181/ITT/16.10	<i>Vibrio harveyi</i>	<i>Litopenaeus vannamei</i>
	202/ITT/08.1	<i>Vibrio harveyi</i>	<i>Dicentrarchus labrax</i>	332/ITT/16.1	<i>Vibrio harveyi</i>	<i>Luthjanus kasmika</i>
	210/ITT/09.1	<i>Vibrio harveyi</i>	<i>Mugil cephalus</i>	222/ITT/17.3	<i>Vibrio harveyi</i>	<i>Dicentrarchus labrax</i>
	208/ITT/12.1	<i>Vibrio harveyi</i>	<i>Henicopus acuminatus</i>	236/ITT/17.2	<i>Vibrio harveyi</i>	<i>Mytilus galloprovincialis</i>

**Tabella 9:** Elenco delle specie batteriche comparate mediante analisi del gene *pyrH*. Per le sequenze disponibili in GenBank® è riportato l'accession number corrispondente.

## 2.1.4 Identificazione proteomica

### 2.1.4.1 Preparazione dei campioni batterici

I ceppi sottoposti ad analisi sono stati coltivati in AS per 24 ore. Per l'analisi di ciascun ceppo sono stati prelevati 5-10 mg di colonia batterica, addizionati in provetta con 300  $\mu$ l di acqua ultrapura e 900  $\mu$ l di etanolo assoluto; dopo aver ultracentrifugato ed eliminato il surnatante si è lasciato asciugare il pellet batterico per circa 1 ora. Successivamente sono stati aggiunti 50  $\mu$ l di acido formico 70% e volume equivalente di soluzione satura di  $\alpha$ -Ciano-4-idrossinnamico (HCCA) in 50% di Acetonitrile (ACN) miscelando accuratamente. 1  $\mu$ l di surnatante è stato deposto su uno spot della piastra metallica, lasciato evaporare e ricoperto con 1  $\mu$ l di solvente organico (soluzione della Matrice) composto da ACN e 2,5% di acido Tri-Fluoro-Acetico (TFA) in soluzione acquosa ottenendo la cristallizzazione del campione. La piastra metallica contenente i campioni è stata successivamente analizzata dallo strumento MALDI Biotyper Microflex LT (Bruker Daltonics GmbH, DE) mediante il software MALDI Biotyper RTC 3.0 "Software for microorganism identification and classification". Tutti i ceppi sono stati analizzati in duplicato.

### 2.1.4.2 Analisi MALDI-TOF

Gli spettri pmf ottenuti dai ceppi in esame sono stati comparati con il database Bruker Daltonics DB4613 (5627 spettri) e un database accessorio sviluppato precedentemente dal Centro Specialistico Ittico (IZSVe) con *type strain* e ceppi di referenza acquisiti da ceppoteche internazionali (ATCC<sup>®</sup>, DSMZ, CECT, BCCM/LMG) di specie batteriche patogene per gli organismi acquatici. In particolare questo database accessorio è stato implementato con ceppi della famiglia Vibrionaceae (57 ceppi), 35 specie appartenenti al genere *Vibrio* (52 ceppi di referenza) e 2 specie al genere *Photobacterium* (5 ceppi). Gli spettri di questi ceppi sono stati standardizzati mediante analisi ripetuta 12 volte per singolo batterio. Per ciascun ceppo di campo analizzato è stato prodotto un report identificando le migliori 10 assegnazioni di specie basati sugli spettri dei due database. Ogni assegnazione di specie presentava uno punteggio (score) variabile tra 0 e 3. Con score > 2,300 l'identificazione di genere e specie è stata considerata attendibile, mentre con score compreso tra 2,00 e 2,300 l'identificazione di genere attendibile e identificazione di specie probabile. Per score inferiori a 1,699 identificazione non è stata considerata attendibile.

### 2.1.5 Valutazione dell'antibiotico-resistenza

La sensibilità degli isolati di *V. harveyi* nei confronti dei principali antibiotici impiegati in acquacoltura è stata valutata mediante due metodi: metodo per diffusione su terreno Mueller Hinton agarizzato (Kirby-Bauer *disk diffusion test*) e microdiluizione in brodo con determinazione della *Minimal Inhibitory Concentration* (MIC). Gli antibiotici selezionati per entrambi i metodi sono stati: ampicillina, florfenicolo, flumequina, sulfametossazolo potenziato con trimethoprim, tetraciclina (registrati in Italia o utilizzabili in deroga come premiscele medicate) ed enrofloxacin, in quanto impiegata frequentemente nelle specie ornamentali. Il metodo per diffusione Kirby-Bauer effettuato routinariamente presso il laboratorio CSI-IZSve è stato applicato seguendo le linee guida EUCAST e CLSI (VET-03-A 2006 (CLSI, 2006) e M100 S24 – 2014 (CLSI, 2014b)) e l'interpretazione dei risultati si è basata sui parametri disponibili per la famiglia Enterobacteriaceae, in assenza di valori di *cutoff* che consentissero di esprimere un giudizio di sensibilità/resistenza specifici per i patogeni del genere *Vibrio*. L'analisi della MIC è stata svolta seguendo le linee guida CLSI M07-A9 (CLSI, 2012) e VET04-A2 (CLSI, 2014) impiegando micropiastre contenenti un pannello predosato standard per Enterobacteriaceae (Merlin<sup>®</sup>-Diagnostika, DE). In mancanza di informazioni preliminari sui valori di MIC attesi nella specie *V. harveyi* sono stati costituiti dei gruppi di ceppi ambientali, probabili “*wild type*”, da comparare con ceppi “*non wild type*” isolati da episodi clinici. In particolare dai ceppi della collezione sono stati selezionati ed analizzati 9 ceppi ambientali isolati da molluschi bivalvi in Mar Adriatico e Mar Ligure ed il type strain *V. harveyi* LMG 4044 (ATCC 14126) isolato in anfipode. Per i ceppi clinici sono stati valutati 30 isolati da specie allevate (27 da branzino, 3 da orata) in allevamenti mediterranei, e 10 isolati da specie ornamentali (7 ceppi da pesci ornamentali, 3 ceppi isolati dall'acqua di acquari pubblici) ed il ceppo *V. harveyi* CECT 4215 isolato in squalo grigio. Per ciascuno dei tre gruppi di isolati (ambientali, specie allevate, ornamentali) è stato calcolato il valore di MIC<sub>50</sub> e MIC<sub>90</sub>.

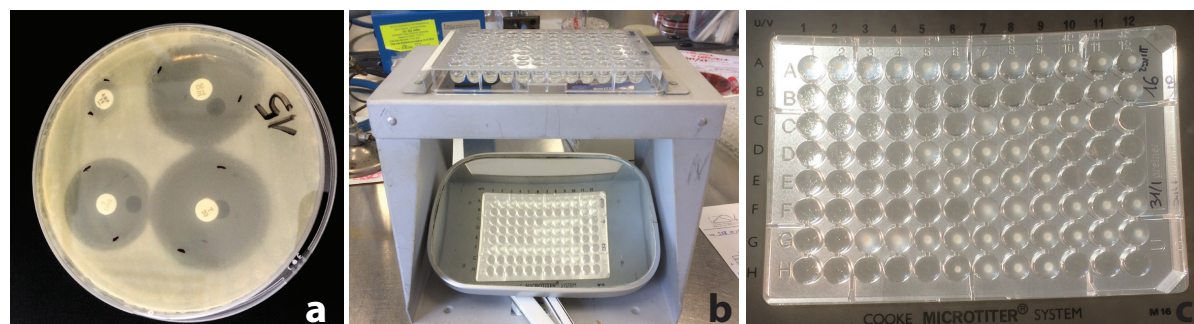
#### 2.1.5.1 Antibiogrammi mediante diffusione (test Kirby-Bauer)

Dopo incubazione per 18 ore in AS a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , sono state prelevate 4-5 colonie e sospese in 5 ml di soluzione fisiologica per ottenere una densità ottica di 0,5 McFarland, valutata mediante nefelometro (CrystalSpec, Becton Dickson, USA), pari a circa  $2 \times 10^8$  ufc/ml. La sospensione è stata seminata con tampone nelle tre direzioni, al fine di ottenere una distribuzione omogenea, su piastre Mueller Hinton 2%NaCl. Successivamente sono stati applicati i dischetti contenenti i seguenti antibiotici: ampicillina (Oxoid<sup>™</sup>); florfenicolo (Oxoid<sup>™</sup>); flumequina (Oxoid<sup>™</sup>); sulfametossazolo + trimethoprim (BD BBL<sup>™</sup>); tetraciclina (BD BBL<sup>™</sup>) ed enrofloxacin (BD BBL<sup>™</sup>) (concentrazioni ed acronimi sono riportati in Tabella 10).

Le piastre sono state incubate per 24 ore a  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  e gli aloni di inibizione di crescita sono stati valutati mediante calibro misurandone il diametro (Tav. 1, Fig. a) e comparando il risultato in mm con le tabelle di riferimento per i rispettivi antibiotici secondo le linee guida del CLSI (CLSI, 2006; CLSI, 2014b) per la famiglia Enterobacteriaceae. Ciascun ceppo analizzato è stato valutato come resistente, intermedio o sensibile per ciascun antibiotico testato. L'antibiotico ossitetraciclina (BD BBL™), non presente nelle micropiastre per la determinazione della MIC, è stato valutato solo in alcuni ceppi, selezionati in base ai risultati preliminari ottenuti dagli altri antibiotici.

PRINCIPIO ATTIVO	CONCENTRAZIONE	RESISTENTE	INTERMEDIO	SENSIBILE
Ampicillina	AMP 25 $\mu\text{g}$ *	$\leq 13$ mm	14-16 mm	$\geq 17$ mm
Enrofloxacin	ENR 5 $\mu\text{g}$ °	$\leq 17$ mm	18-21 mm	$\geq 22$ mm
Florfenicolo	FFC 30 $\mu\text{g}$ *	$\leq 14$ mm	15-18 mm	$\geq 19$ mm
Flumequina	UB 30 $\mu\text{g}$ *	$\leq 12,5$ mm	13-19 mm	$\geq 20$ mm
Tetraciclina	TE 30 $\mu\text{g}$ °	$\leq 14$ mm	15-18 mm	$\geq 19$ mm
Sulfametossazolo + Trimethoprim	SXT 23,75 + 1,25 $\mu\text{g}$ °	$\leq 10$ mm	11-15 mm	$\geq 16$ mm
Ossitetraciclina	T 30 $\mu\text{g}$ °	$\leq 14$ mm	15-18 mm	$\geq 19$ mm

**Tabella 10:** Categorizzazione dei diametri degli aloni di inibizione degli antibiotici impiegati in Kirby-Bauer. (\*) Oxoid™ (Thermo Scientific); (°) BD BBL™ Sensi-Disk™ (Becton, Dickison and Co. NY,USA)



**Tavola 1:** Valutazione dell'antibiotico resistenza mediante diffusione in agar (Kirby-Bauer) e microdiluzione in brodo (MIC). **Fig a:** Aloni di inibizione della crescita batterica su terreno Mueller Hinton 2%NaCl post 24 ore di coltivazione a  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ . **Fig. b:** Lettura mediante specchio concavo delle microdiluzione in brodo eseguita in micropiastre a 96 pozzetti. **Fig. c:** Osservazione della crescita nei diversi pozzetti comparandola con il risultato osservato nei controlli (pozzetti A11-A12).

### 2.1.5.2 Microdiluzione in brodo (MIC)

La determinazione della MIC mediante il metodo della microdiluzione in brodo è stata condotta impiegando micropiastre Micronauts-S (Merlin-Diagnostika GmbH, DE) da 96 pozzetti contenenti antibiotici predosati (pannello per Enterobacteriaceae) alle concentrazioni riportate in Tabella 11. Per ciascun ceppo l'inoculo delle micropiastre è stato preparato partendo da colonie di 18 ore in AS



secondo il protocollo CLSI (2014). 4-5 colonie sono state sospese in 5 ml di fisiologica standardizzando la torbidità con nefelometro a 0,5 McFarland. 100 µl di sospensione batterica sono stati diluiti in 11 ml di CAMHB, e 100 µl della brodocoltura CAMHB sono stati distribuiti nei pozzetti della micropiastre. La concentrazione batterica finale nei pozzetti corrispondeva a circa  $5 \times 10^5$  ufc/ml. Le piastre ricoperte da pellicola sono state incubate a  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  per 24 ore e successivamente valutate mediante osservazione con specchio concavo (Tav. 1, Fig. b). I pozzetti che presentavano torbidità o un bottone depositato sul fondo del pozzetto di almeno 2 mm di diametro sono stati considerati positivi per crescita batterica (Tav. 1, Fig. c). Il valore di MIC è stato definito come la più bassa concentrazione di principio attivo in grado di inibire la crescita batterica, corrispondente al pozzetto con concentrazione minore in cui non si osserva crescita. Nel caso del sulfametossazolo potenziato con trimethoprim la MIC è stata considerata quella in grado di determinare una riduzione  $\geq 80\%$  della crescita batterica rispetto ai pozzetti di controllo privi di antimicrobico. Per determinare la concentrazione minima di ciascun antibiotico in grado di inibire la crescita nel 50% (MIC<sub>50</sub>) o nel 90% (MIC<sub>90</sub>) dei ceppi analizzati è stato calcolato il 50° percentile (mediana) ed il 90° percentile della distribuzione delle MIC applicando il software statistico Stata 12.1. I valori di MIC sono stati inseriti in Stata come valori numerici e nel caso di risultati al limite delle concentrazioni presenti nelle micropiastre ( $>32$  µg/ml;  $<1$  µg/ml) si è deciso di applicare un valore pari alla concentrazione superiore (se  $>32$  allora MIC= 64) o inferiore (se  $<1$ , MIC= 0,5). Per ogni antibiotico sono stati calcolati sia gli indici complessivi per i 51 ceppi di *V. harveyi*, sia quelli stratificati per tipologia di origine dei ceppi (ceppi clinici, ambientali, ornamentali).

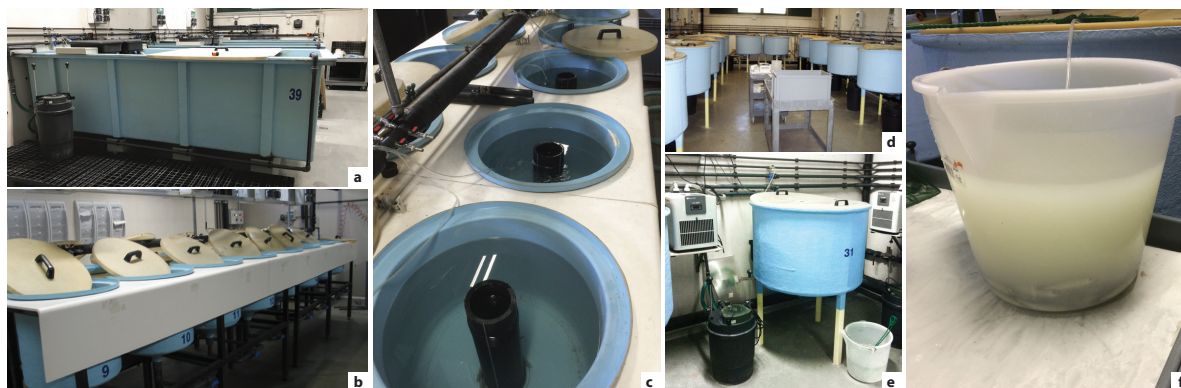
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Amp 32	Amp 16	Amp 8	Amp 4	Amp 2	Amp 1	Amp 0,5	Amp 0,25	Amp 0,125	Amp 0,0625	CTR	CTR
B	Enr 32	Enr 16	Enr 8	Enr 4	Enr 2	Enr 1	Enr 0,5	Enr 0,25	Enr 0,125	Enr 0,0625	Enr 0,0312	Enr 0,0156
C	Gen 32	Gen 16	Gen 8	Gen 4	Gen 2	Gen 1	Gen 0,5	Gen 0,25	Gen 0,125	Gen 0,0625	Flm 0,25	Flm 0,5
D	Amn 32	Amn 16	Amn 8	Amn 4	Amn 2	Amn 1	Amn 0,5	Amn 0,25	Amn 0,125	Flm 1	Flm 2	Flm 4
E	Apr 64	Apr 32	Apr 16	Apr 8	Apr 4	Apr 2	Apr 1	Apr 0,5	Apr 0,25	Flm 8	Flm 16	Flm 32
F	Col 8	Col 4	Col 2	Col 1	Col 0,5	Col 0,25	Col 0,125	Col 0,0625	Col 0,0312	Col 0,0156	Fll 1	Fll 2
G	Tet 16	Tet 8	Tet 4	Tet 2	Tet 1	Tet 0,5	Tet 0,25	Tet 0,125	Tet 0,0625	Tet 0,0312	Fll 4	Fll 8
H	T/S 16/304	T/S 8/152	T/S 4/76	T/S 2/38	T/S 1/19	T/S 0,5/9,5	T/S 0,25/4, 75	T/S 0,125/ 2,373	T/S 0,0625/ 1,1875	Fll 16	Fll 32	Fll 64

**Tabella 11:** Concentrazioni antibiotiche presenti nei pozzetti della micropiastre impiegata per la determinazione delle MIC. Ampicillina (Amp), Apramicina (Apr), Colistina (Col), Enrofloxacin (Enr), Florfenicolo (Fll), Flumequina (Flm), Gentamicina (Gen), Aminosidina (Amn), Tetraciclina (Tet), Trimethoprim + Sulfametossazolo (T/S). Le concentrazioni sono espresse in µg/ml.

## 2.2 PROVE DI INFEZIONE IN BRANZINO

### 2.2.1 Set-up sperimentale

Le prove di infezione sono state condotte presso l'acquario sperimentale IZSVe (Legnaro, PD). Circa 1400 branzini sono stati acquistati ad una taglia di circa 2 g, non vaccinati per *V. anguillarum*-*V. ordalii*. Sono stati quarantenati e sottoposti a test virologici, parassitologici e batteriologici per escludere la presenza di patogeni. Sono stati mantenuti in stabulazione in 2 vasche di 2500 litri ad una temperatura di 22°C e salinità di 33‰ (Tav. 2, Fig. a), alimentati con pellet commerciale e prelevati progressivamente per l'impiego nelle prove sperimentali. Le prove di infezione sono state attuate in vasche tronco-coniche (250 l) in vetroresina (Tav. 2, Fig. d-e), dotate di filtro esterno a cestello e UV dedicato, ad una temperatura di 24°C e salinità di 33‰, mantenendo un fotoperiodo artificiale controllato di 8 ore di luce e 16 ore di buio. Le prove iniziali di infezione sono state effettuate, dato il numero ridotto di esemplari, in vasche cilindriche (60 l) dotate di aeratore, effettuando un cambio d'acqua ogni 48 ore (50%), con i medesimi parametri idrici e di fotoperiodo (Tav. 2, Fig. b-c). Il protocollo sperimentale basato su prove di patogenicità, sicurezza ed efficacia vaccinale è stato valutato ed approvato dal Ministero della Salute (Direzione Generale Sanità Animale e dei Farmaci Veterinari, Ufficio VI) con autorizzazione n° 776/2015-PR.



**Tavola 2:** Vasche impiegate per la stabulazione e le prove di infezione e vaccinazione presso l'acquario sperimentale IZSVe. **Fig.a:** vasche di stabulazione. **Fig. b - c:** vasche cilindriche impiegate nelle prime prove di patogenicità. **Fig d-e:** vasche tronco-coniche per le prove di vaccinazione. **Fig. f:** prova di vaccinazione per immersione.

## 2.2.2 Selezione e preparazione ceppi di *V. harveyi*

10 ceppi di *V. harveyi* sono stati scelti per valutare sperimentalmente la loro patogenicità in vivo mediante inoculo IP ed immersione in giovanili di branzino. La scelta dei ceppi è ricaduta su quelli isolati dalla specie di interesse (*D. labrax*), originati da allevamenti differenti per localizzazione geografica (Mar Tirreno, Mar Adriatico, Canale di Sicilia, Mar Egeo, Turchia), tipologia di allevamento (raceway, gabbie a mare, avannotterie) e taglia degli esemplari affetti (avannotti, giovanili <10 g e subadulti 80-130 g). Si è tenuto conto anche della variabilità fenotipica per quanto riguarda l'attività emolitica in AS, luminescenza e metabolismo (API20E).

CEPPO	CODICE IZSve	OSPITE	LOCALITA'	ANNO	ORGANO	EMOLISI	CHROMagar Vibrio	LUMINESCENZA	O/129 (150 µg)	O/129 (10µg)	CODICE API 20 E
I	30 ITT 14. 2	Branzino	Mar Tirreno - Lazio	2011	cervello	-	LILLA + BIANCO	+	S	S	4344125
II	30 ITT 14. 7	Branzino	Gabbie a mare - Canale di Sicilia	2013	-	-	ROSA + BIANCO	-	S	S	4356525
III	30 ITT 14. 16	Branzino	Raceway a terra - Puglia	2011	cervello	-	ROSA + BIANCO	-	S	S	4346525
IV	207 ITT 14. 5	Branzino	Gabbie a mare - Mar Tirreno - Lazio	2014	cervello	α emolitico 24 h	BIANCASTRO	+	S	S	4344525
V	247 ITT 14. 4	Branzino	Gabbie a mare - Mar Tirreno - Toscana	2014	rene	α emolitico 48 h	ROSA + BIANCO	-	S	S	4344125
VI	55/ITT/15. 3	Branzino	Gabbie a mare - Adriatico Orientale	2014	-	α emolitico 48 h	ROSA + BIANCO	-	S	R	4346525
VII	55/ITT/15. 7	Branzino	Mar Tirreno - Lazio	2015	-	β emolitico 48 h	BIANCASTRO	-	S	R	4344525
VIII	55/ITT/15. 16	Branzino	Raceway a terra - Toscana	2014	-	α emolitico 24 h	BIANCASTRO	-	S	R	4346525
IX	110 /ITT/15. 2	Branzino	Mar Egeo - Creta	-	-	α emolitico 24 h	ROSA + BIANCO	-	S	R	4346525
X	26/ITT/16. 14	Branzino	Avannotteria inland - Turchia	2016	cute	β emolitico 48 h	ROSA	-	S	R	4346125

**Tabella 12:** Variabilità fenotipica dei ceppi selezionati per le prove di patogenicità in branzino

Ogni ceppo è stato riattivato in provette di TSB 2%NaCl a partire da perline (Microbank™, ceppoteca -35 ± 2°C), sub-coltivato per 24 ore e fatto crescere in 250 ml di TSB 2% per 12 h a 25 ± 2°C. I brodi sono stati successivamente centrifugati con centrifuga Megafuge 1.0R (Kendro, DE) a 3000 rpm per 15 minuti a 22°C. Dopo aver eliminato il surnatante il pellet batterico è stato risospeso in SF e centrifugato ripetendo l'operazione per altre 2 volte. Al termine dei 3 lavaggi i pellet sono stati risospesi in un volume standard (10 ml) e la concentrazione batterica (ufc/ml) è stata determinata mediante analisi di un'aliquota con spettrofotometro Ultrospec 3000 (Pharmacia Biotec, Cambridge, UK) operante a 550 nanometri. Successivamente ciascun ceppo è stato standardizzato alla concentrazione voluta mediante diluizione in SF, riconfermata mediante analisi spettrofotometrica. A seguito della prima infezione IP (pre-challenge) i ceppi batterici sono stati re-isolati da encefalo di *D. labrax* morti con sintomatologia. Questi isolati rivirulentati sono stati inseriti in provette Microbank™ e stoccati a -35 ± 2°C per le successive riattivazioni dei ceppi ad uso vaccinale e per prove di infezione.

## 2.2.3 Infezione mediante inoculo IP (Pre-challenge)

I dieci ceppi batterici in esame sono stati standardizzati ad una concentrazione di  $6 \times 10^8$  ufc/ml. Gruppi di 8 esemplari di branzino (150-250 g) per ciascun ceppo batterico sono stati sedati mediante immersione in acqua di stabulazione contenente tricaina metansolfonato MS-222 (30-40 mg/l) ed iniettati IP con un volume di inoculo di 0,5 ml, ottenendo una concentrazione effettiva di  $3 \times 10^8$  ufc/esemplare. Gli esemplari sono stati inseriti nelle vasche tronco-coniche (250 l) e mantenuti in

osservazione, con controlli ogni 12 ore nei primi 3 giorni. Segni clinici quali melanosi, iperventilazione, nuoto erratico sono stati riportati e gli esemplari venuti a morte sono stati sottoposti a necropsia con prelievo di tessuti per analisi istologica e prelievo batteriologico da encefalo e rene cefalico per confermare il re-isolamento del ceppo batterico. La sperimentazione è stata terminata a 21 giorni dall'infezione e gli esemplari sopravvissuti sono stati soppressi mediante sovraddosaggio di anestetico MS-222 (500-800 mg/l), prelevando da ciascuno di essi campioni ematici (siero), istologici e batteriologici.

#### 2.2.4 Infezione mediante immersione

8 ceppi in grado di causare significativa mortalità per iniezione IP (100% nel pre-challenge) sono stati testati per immersione su gruppi di 10 esemplari di branzino (3-4 g). Ciascun ceppo rivirulentato è stato fatto crescere in 800 ml brodo TSB 2% NaCl per 12 h a 25°C, lavato secondo protocollo (vedasi paragrafo 2.2.2) e standardizzato ( $3 \times 10^9$  ufc/ml in 50 ml) per ottenere una concentrazione finale di  $1,5 \times 10^7$  ufc/ml nel bagno infettante. I branzini sono stati infettati mediante immersione nella soluzione batterica diluita in 10 l di acqua marina (aerata) per 2 ore e successivamente ricollocati nelle vasche cilindriche di stabulazione (60 l). La vitalità dei ceppi nel bagno infettante è stata valutata prelevando al termine della prova un'ansata delle soluzioni e seminandole in AS. La prova è stata monitorata per 21 giorni. Gli esemplari venuti a morte sono stati sottoposti ad analisi batteriologica (encefalo e rene cefalico); al termine della sperimentazione 3 esemplari da ciascun gruppo sono stati campionati per analisi batteriologiche ed istologiche.

#### 2.2.5 Selezione dei ceppi più virulenti mediante inoculo IP

6 ceppi patogeni in IP sono stati ulteriormente valutati per iniezione IP ad una concentrazione di inoculo inferiore ( $3,6 \times 10^5$  ufc/esemplare) per selezionare i 3 ceppi più patogeni da impiegare nella formulazione del vaccino polivalente e nelle prove di efficacia vaccinale. Il ceppo VIII è stato incluso direttamente tra i ceppi più virulenti essendo l'unico a causare mortalità anche per immersione. Le prove di infezione sono state condotte su gruppi di 10 esemplari (5-6 g) per ceppo, iniettando IP 0,1 ml di inoculo. Gli esemplari sono stati collocati in vasche cilindriche e monitorati per 21 giorni. Dopo 96 ore dall'inoculo IP è stato prelevato 1 litro d'acqua da ciascuna vasca per valutare la presenza di cellule di *V. harveyi* rilasciate nel medium dagli esemplari sintomatici. L'acqua è stata ultrafiltrata su filtri con porosità 0,45 µm, collocati in TSB 2% NaCl per 24 h a 25°C e un'aliquota è stata seminata in AS e TCBS. Singole colonie isolate sono state valutate in macrometodo e fenotipicamente per luminescenza. Esami batteriologici di re-isolamento sono stati condotti sugli esemplari venuti a morte ed al termine della sperimentazione 3 esemplari per gruppo sono stati sottoposti ad analisi batteriologiche ed istologiche.

## 2.2.6 Determinazione della DL<sub>70</sub> dei ceppi virulenti

Per determinare con precisione la DL<sub>70</sub> per inoculo IP dei quattro ceppi più patogeni (ceppo I, II, VI e VIII) sono state valutate 5 concentrazioni di inoculo. Per evitare di sopprimere ulteriori animali le due concentrazioni precedentemente testate in IP (pre-challenge) sono state ritenute valide e comparabili. Cinque gruppi di 12 esemplari (5-6 g) sono stati esposti a 3 concentrazioni crescenti per via I.P. (4 concentrazioni per il ceppo VIII) come riportato in tabella 13. Per determinare la DL<sub>70</sub> per immersione i 4 ceppi patogeni sono stati testati complessivamente a 3 concentrazioni differenti su 12 esemplari per gruppo. Gli esemplari sono stati monitorati per 21 giorni. Per ogni ceppo patogeno è stata calcolata la DL<sub>70</sub> secondo il modello Probit, con software SAS 9.4 (Mancin et al., 2010).

CEPPO <i>V. HARVEYI</i>	INOCULO IP		IMMERSIONE	
	CONCENTRAZIONE BATTERICA	N° ESEMPLARI	CONCENTRAZIONE BATTERICA	N° ESEMPLARI
I	$3,0 \times 10^8$ ufc/esemplare	8 pre-challenge	$1 \times 10^9$ ufc/ml	12
	$3,0 \times 10^7$ ufc/esemplare	12	$1 \times 10^8$ ufc/ml	12
	$3,0 \times 10^6$ ufc/esemplare	12	$1,5 \times 10^7$ ufc/ml	10
	$3,6 \times 10^5$ ufc/esemplare	10		
	$3,0 \times 10^4$ ufc/esemplare	12		
II	$3,0 \times 10^8$ ufc/esemplare	8 pre-challenge	$1 \times 10^9$ ufc/ml	12
	$3,0 \times 10^7$ ufc/esemplare	12	$1 \times 10^8$ ufc/ml	12
	$3,0 \times 10^6$ ufc/esemplare	12	$1,5 \times 10^7$ ufc/ml	10
	$3,6 \times 10^5$ ufc/esemplare	10		
	$3,0 \times 10^4$ ufc/esemplare	12		
VI	$3,0 \times 10^8$ ufc/esemplare	8 pre-challenge	$1 \times 10^9$ ufc/ml	12
	$3,0 \times 10^6$ ufc/esemplare	12	$1 \times 10^8$ ufc/ml	12
	$3,6 \times 10^5$ ufc/esemplare	10	$1,5 \times 10^7$ ufc/ml	10
	$3,0 \times 10^4$ ufc/esemplare	12		
	$3,0 \times 10^3$ ufc/esemplare	12		
VIII	$3,0 \times 10^8$ ufc/esemplare	8 pre-challenge	$1 \times 10^9$ ufc/ml	12
	$3,0 \times 10^6$ ufc/esemplare	12	$1 \times 10^8$ ufc/ml	12
	$3,0 \times 10^5$ ufc/esemplare	12	$1,5 \times 10^7$ ufc/ml	10
	$3,0 \times 10^4$ ufc/esemplare	12		
	$3,0 \times 10^3$ ufc/esemplare	12		

**Tabella 13:** Concentrazioni batteriche impiegate nelle prove di patogenicità per inoculo IP e immersione per i diversi ceppi di *V. harveyi*.

## 2.3 PREPARAZIONE VACCINALE

Il vaccino contro *V. harveyi* è stato sviluppato come vaccino a microrganismo intero inattivato mediante formaldeide. Tre ceppi di *V. harveyi* altamente patogeni in branzino, identificati durante le prove di infezione, sono stati impiegati nella preparazione vaccinale (ceppo II, VI e VIII). Il vaccino polivalente è stato sviluppato in modalità differenti in base alla via di somministrazione (IP, IP adjuvato, immersione). Il vaccino somministrato per via iniettiva IP oltre alle cellule batteriche è stato addizionato con estratto extracellulare (ECP) ottenuto dai 3 ceppi batterici. Inoltre la medesima preparazione è stata emulsionata in adjuvante oleoso Montanide™ 763 AVG (Seppic, FR) per valutare la protezione indotta dall'associazione con adjuvante. Il vaccino per immersione è stato prodotto unicamente con batteri inattivati con formaldeide ed in seguito diluiti nel bagno vaccinale.

### 2.3.1 Vaccino polivalente

Per la preparazione del pellet batterico i tre ceppi di *V. harveyi* selezionati (Cp. II, VI, VIII) sono stati riattivati in TSB 2% NaCl a partire dagli isolati rivirulentati in vivo. Un'aliquota di brodo torbido (24h) di ciascun ceppo è stata impiegata come inoculo di 3 bottiglie contenenti 7 l di TSB 2% mantenuto in agitazione a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ . Dopo 20 ore di coltivazione e prima dell'inattivazione con formaldeide la concentrazione batterica dei brodi è stata valutata con spettrofotometro per verificare la concentrazione e la crescita omogenea dei tre ceppi. 30 ml di formaldeide 37% sono stati addizionati ad ogni bottiglia per ottenere una concentrazione finale di  $\approx 0,4\%$  di formaldeide. I brodi inattivati sono stati mantenuti in agitazione per 24 h e successivamente è stata seminata in AS un'aliquota di ogni brodo per valutare l'avvenuta inattivazione. In seguito i brodi sono stati centrifugati separatamente a 4500 rpm per 15 min mediante centrifuga Avanti™ Centrifuge J-25 (Beckman Instruments Inc., CA, USA) ed il pellet batterico è stato risospeso in SF (2 lavaggi) e stoccato a  $+4 \pm 2^\circ\text{C}$ . L'ECP è stato prodotto seguendo la tecnica di coltura su cellophane descritta in (Liu, 1957) e modificata da (Arijo et al., 2005). In breve, per ciascun ceppo vaccinale, 200  $\mu\text{l}$  di brodo TSB 2% sono stati spatolati su piastra TSA 2% ricoperta da cellophane sterilizzato; dopo crescita a  $25^\circ\text{C}$  per 8 ore, è stato aggiunto 1 ml di SF e le piastre sono state incubate per 24 h. Surnatante e cellule batteriche sono stati raccolti dalle piastre addizionando circa 1 ml di SF ed ultracentrifugati a 10.000 rpm per 10 minuti. Il surnatante è stato prelevato e filtrato con filtri 0,45  $\mu\text{m}$  Millex®-HV e 0,22  $\mu\text{m}$  Millex®GV (Millipore Corp., IE) e la concentrazione proteica è stata valutata mediante spettrofotometro NanoDrop Lite. La concentrazione proteica (espressa in mg/ml) è stata calcolata in base all'assorbanza a 280 nm utilizzando come controllo albumina sierica bovina. Successivamente l'estratto proteico è stato inattivato mediante riscaldamento a  $99^\circ\text{C}$  per 30' in termoblocco Thermomixer comfort (Eppendorf AG, Hamburg, DE) e stoccato a  $+4 \pm 2^\circ\text{C}$ .

Per la preparazione del vaccino IP adjuvato, la soluzione batterica è stata emulsionata con l'adjuvante Montanide™ 763 AVG (Seppic) secondo un rapporto volumetrico ottimale 30:70 (antigene:adjuvante). In particolare un'aliquota di pellet batterico di ciascun ceppo è stata prelevata ( $\approx$  2 g) ed omogenata alle altre. 2,74 g di pellet batterico è stato risospeso in 6 ml di ECP standardizzato ad una concentrazione proteica di 7,7 mg/ml. La sospensione batterica è stata emulsionata con 14 ml di Montanide™ 763 AVG per 30 secondi con omogeneizzatore Ultra Turrax® in provetta mantenuta su ghiaccio fondente. L'omogeneità delle micelle di emulsione è stata valutata al microscopio ottico. Il vaccino adjuvato è stato stoccato in provetta di vetro a  $+4 \pm 2^\circ\text{C}$  fino al momento dell'uso. La concentrazione batterica finale del vaccino adjuvato è risultata di  $5 \times 10^{10}$  ufc/ml.

Per la preparazione del vaccino IP non adjuvato si è utilizzata la medesima procedura diluendo la sospensione batterica in ECP (2,74 g in 6 ml) in 14 ml di SF ottenendo una concentrazione finale di  $5 \times 10^{10}$  ufc/ml.

Per la preparazione del vaccino per immersione, il pellet batterico dei 3 ceppi vaccinali è stato omogenato e risospeso in SF. La concentrazione batterica totale è stata determinata mediante spettrofotometro ( $1,4 \times 10^{13}$  ufc/ml). La soluzione vaccinale è stata somministrata diluita in acqua marina di stabulazione ad una concentrazione finale di  $1 \times 10^9$  ufc/ml.

### 2.3.2 Protocollo vaccinale

La vaccinazione per immersione è stata eseguita su 160 branzini di  $10 \pm 2$  g, immergendoli per 15 minuti in un recipiente contenente 15 litri di soluzione batterica ( $1 \times 10^9$  ufc/ml) abbondantemente aerata (Tav. 2, Fig. f). Gli esemplari sono stati ricollocati nelle vasche di stabulazione e, a distanza di 4 settimane, è stata eseguita una seconda vaccinazione *booster* analoga per esposizione (tempo e concentrazione batterica). La vaccinazione per inoculo IP con adjuvante è stata eseguita su 90 branzini di  $10 \pm 2$  g, sedati mediante immersione in acqua di stabulazione contenente MS-222 (30-40 mg/l) ed iniettati con un volume vaccinale di 0,1 ml. La vaccinazione per inoculo IP senza adjuvante (0,1 ml) è stata eseguita nel medesimo modo in un gruppo di 90 branzini.

Un gruppo di 90 esemplari (controllo non vaccinato IP) è stato manipolato nel medesimo modo ed iniettato con un inoculo di 0,1 ml di SF; 40 esemplari manipolati ma non esposti al vaccino sono stati impiegati come controllo non vaccinato per immersione.

### 2.3.3 Prove di *safety* vaccinale

Per valutare eventuali effetti avversi della preparazione vaccinale adjuvata somministrata IP dovuti ad effetto tossico acuto dell'estratto extracellulare o ad eccessiva risposta flogistica cronica elicitata dall'adjuvante Montanide™ 763 AVG, 40 esemplari ( $10 \pm 2$ g) sono stati inoculati IP con dose doppia di vaccino (0,2 ml) e mantenuti in osservazione per 12 settimane. Al termine di tale periodo sono stati

soppressi mediante sovraddosaggio di anestetico (MS-222), un campione di sangue è stato prelevato da tutti i soggetti ed è stato eseguito un esame necroscopico per valutare il grado di assorbimento dell'adjuvante, l'adesione dei visceri celomatici e l'eventuale presenza di granulomi viscerali e di melanizzazioni a livello della parete muscolare. 10 esemplari sono stati sottoposti ad esame istologico. La medesima prova di safety vaccinale è stata condotta con inoculo di vaccino IP non adjuvato in dose doppia (0,2 ml) in 40 esemplari mantenuti in osservazione per 30 giorni

#### 2.3.4 Prove di efficacia vaccinale

L'efficacia della protezione vaccinale (*potency challenge*) è stata valutata in vivo mediante infezione con 2 ceppi di *V. harveyi* omologhi a quelli inseriti nelle preparazioni vaccinali (Cp. II e VIII) ed un ceppo eterologo (Cp. I). Lo schema delle infezioni è riportata in Tabella 14. L'infezione per immersione e inoculo IP è stata effettuata contemporaneamente in tutti i gruppi vaccinati e negli esemplari dei gruppi di controllo con concentrazione di inoculo batterico basata sulla  $DL_{70}$  di ciascun ceppo. Gli esemplari vaccinati per immersione sono stati sottoposti a prova di infezione via IP con i tre ceppi virulenti per valutare la presenza di una risposta immunitaria proteggente sistemica (sierica), mentre sono stati infettati per immersione per valutare la risposta immunitaria mucosale, con l'unico ceppo in grado di dare mortalità (Cp. VIII) come evidenziato dalle precedenti prove di patogenicità. Il *challenge* è stato effettuato dopo 7 settimane dal secondo trattamento vaccinale, dividendo gli esemplari in gruppi di 40, per ciascun ceppo via IP e per immersione. Gruppi di 30 esemplari vaccinati IP con vaccino adjuvato sono stati divisi in vasche separate e sottoposti a challenge IP 12 settimane dopo la vaccinazione mentre esemplari vaccinati IP senza adjuvante sono stati infettati allo stesso modo 30 giorni dopo la vaccinazione. I branzini sono stati osservati per 28 giorni post infezione e la morbilità/mortalità è stata registrata giornalmente. Nell'arco delle prime 96 ore post-challenge il monitoraggio è stato effettuato ogni 8 ore. Alla fine del periodo di osservazioni gli animali sono stati soppressi e sottoposti a necroscopia per approfondimenti diagnostici (prelievo ematico, batteriologia, esame istologico).



VACCINO		ESEMPLARI		INFEZIONE	
PREPARAZIONE	SOMMINISTRAZIONE	TAGLIA	N°	SOMMINISTRAZIONE	ENDPOINT
Bacterin polivalente + ECP + adjuvante	IP (0,1 ml/eseplare)	> 10 g	30	IP 84 giorni post vaccinazione (ceppo I; $7 \times 10^6$ ufc/eseplare)	28 giorni post infezione
Bacterin polivalente + ECP + adjuvante	IP (0,1 ml/eseplare)	> 10 g	30	IP 84 giorni post vaccinazione (ceppo II; $3 \times 10^6$ ufc/eseplare)	28 giorni post infezione
Bacterin polivalente + ECP + adjuvante	IP (0,1 ml/eseplare)	> 10 g	30	IP 84 giorni post vaccinazione (ceppo VIII; $3 \times 10^5$ ufc/eseplare)	28 giorni post infezione
Bacterin polivalente + ECP	IP (0,1 ml/eseplare)	> 10 g	30	IP 30 giorni post vaccinazione (ceppo I; $7 \times 10^6$ ufc/eseplare)	28 giorni post infezione
Bacterin polivalente +ECP	IP (0,1 ml/eseplare)	> 10 g	30	IP 30 giorni post vaccinazione (ceppo II; $3 \times 10^6$ ufc/eseplare)	28 giorni post infezione
Bacterin polivalente +ECP	IP (0,1 ml/eseplare)	> 10 g	30	IP 30 giorni post vaccinazione (ceppo VIII; $3 \times 10^5$ ufc/eseplare)	28 giorni post infezione
Bacterin polivalente	Immersione per 15', booster post 28 giorni	> 10 g	40	IP 50 giorni post II booster vaccinale (ceppo I; $7 \times 10^6$ ufc/eseplare)	28 giorni post infezione
Bacterin polivalente	Immersione per 15', booster post 28 giorni	> 10 g	40	IP 50 giorni post II booster vaccinale (ceppo II; $3 \times 10^6$ ufc/eseplare)	28 giorni post infezione
Bacterin polivalente	Immersione per 15', booster post 28 giorni	> 10 g	40	IP 50 giorni post II booster vaccinale (ceppo VIII; $3 \times 10^5$ ufc/eseplare)	28 giorni post infezione
Bacterin polivalente	Immersione per 15', booster post 28 giorni	> 10 g	40	Immersione; 50 giorni post II booster vaccinale (ceppo VIII; $1 \times 10^9$ ufc/ml)	28 giorni post infezione
Controllo non vaccinato	IP (0,1 ml SF)	> 10 g	30	IP 30 giorni post inoculo SF (ceppo I; $7 \times 10^6$ ufc/eseplare)	28 giorni post infezione
Controllo non vaccinato	IP (0,1 ml SF)	> 10 g	30	IP 30 giorni post inoculo SF (ceppo II; $3 \times 10^6$ ufc/eseplare)	28 giorni post infezione
Controllo non vaccinato	IP (0,1 ml SF)	> 10 g	30	IP 30 giorni post inoculo SF (ceppo VIII; $3 \times 10^5$ ufc/eseplare)	28 giorni post infezione
Controllo non vaccinato	Manipolato come vaccinazione immersione	> 10 g	40	Immersione; 50 giorni post II manipolazione (ceppo VIII; $1 \times 10^9$ ufc/ml)	28 giorni post infezione

**Tabella 14:** Schema della prima prova di efficacia vaccinale.

In seguito ai risultati non esaustivi dell'infezione IP dovuta alla percentuale di mortalità nei gruppi di controllo (IP) inferiore all'atteso (>70%) è stata condotta una seconda prova di efficacia vaccinale limitata al vaccino somministrato IP senza adjuvante. Sono stati vaccinati esemplari di peso maggiore ( $35 \pm 5$  g) seguendo il protocollo precedentemente descritto, con alcune variazioni nella preparazione della soluzione vaccinale, incrementando la concentrazione di pellet batterico. Inoltre la concentrazione dell'inoculo infettante dei differenti ceppi è stata aumentata in considerazione dei risultati ottenuti dalla precedente prova di infezione. La prova è sintetizzata nella Tabella 15. Alla fine del periodo di osservazioni gli animali sono stati soppressi e sottoposti a necropsia per approfondimenti diagnostici (prelievo ematico, batteriologia, esame istologico).

VACCINO		ESEMPLARI		INFEZIONE	
PREPARAZIONE	SOMMINISTRAZIONE	TAGLIA	N°	SOMMINISTRAZIONE	ENDPOINT
Bacterin polivalente + ECP	IP (0,1 ml/esemplare)	> 30 g	35	IP 30 giorni post vaccinazione (ceppo I; 3×10 <sup>8</sup> ufc/ml)	28 giorni post infezione
Bacterin polivalente +ECP	IP (0,1 ml/esemplare)	> 30 g	35	IP 30 giorni post vaccinazione (ceppo II; 3×10 <sup>8</sup> ufc/ml)	28 giorni post infezione
Bacterin polivalente +ECP	IP (0,1 ml/esemplare)	> 30 g	35	IP 30 giorni post vaccinazione (ceppo VIII; 1×10 <sup>8</sup> ufc/ml)	28 giorni post infezione
Controllo non vaccinato	IP (0,1 ml SF)	> 30 g	38	IP 30 giorni post inoculo SF (ceppo I; 3×10 <sup>8</sup> ufc/ml)	28 giorni post infezione
Controllo non vaccinato	IP (0,1 ml SF)	> 30 g	38	IP 30 giorni post inoculo SF (ceppo II; 3×10 <sup>8</sup> ufc/ml)	28 giorni post infezione
Controllo non vaccinato	IP (0,1 ml SF)	> 30 g	38	IP 30 giorni post inoculo SF (ceppo VIII; 1×10 <sup>8</sup> ufc/ml)	28 giorni post infezione

**Tabella 15:** Schema della seconda prova vaccinale

### 2.3.5 Valutazione dell'efficacia vaccinale

L'efficacia vaccinale è stata valutata considerando la percentuale relativa di sopravvivenza (RPS) (Amend, 1981) calcolata secondo l'equazione:

$$RPS = \left[ 1 - \frac{\%morti\_gruppo\_vaccinato}{\%morti\_gruppo\_non\_vaccinato} \right] \times 100$$

La differenza statistica tra la mortalità dei gruppi vaccinati e dei gruppi di controllo è stata determinata mediante Test Esatto di Fisher (one-tailed). Il test è stato considerato significativo con p-value inferiore a 0,05.

## 2.4 Siero policlonale prodotto in coniglio

Per la produzione di un siero iperimmune policlonale contro *V. harveyi* un coniglio SPF New Zealand White di 6 mesi d'età è stato inoculato sottocute con vaccino polivalente adjuvato con Montanide™ 763 AVG (come illustrato al paragrafo 2.3.1). Un volume totale di 1 ml è stato suddiviso in quattro punti di inoculo nella regione delle spalle e del fianco ed è stato ripetuto 2 volte a distanza di 21 giorni; un campione ematico è stato prelevato a 60 giorni per valutare la risposta anticorpale mediante microagglutinazione in piastra. Data la ridotta risposta immunitaria il coniglio è stato ulteriormente inoculato sottocute con due ceppi di *V. harveyi* vivi alla concentrazione di  $1 \times 10^7$  ufc/ml. 2 mesi dopo l'animale è stato anestetizzato, salassato ed soppresso. Il siero è stato scomplementato mediante riscaldamento a  $+56^\circ\text{C}$  per 30 minuti.

## 2.5 Istologia ed immunoistochimica

L'esame istologico è stato eseguito durante le prove di patogenicità e di sicurezza e di efficacia vaccinale, come precedentemente descritto, su esemplari morti da pochi minuti o agonici al fine di ridurre il più possibile alterazioni autolitiche post-mortali. I singoli organi (arco branchiale, encefalo, occhio, rene cefalico/del tronco, cuore, fegato, milza, stomaco e ciechi pilorici, intestino prossimale, medio e distale, sezione di cute e muscolo) sono stati prelevati e fissati in formalina tamponata 10% per 36-48 h. Successivamente i tessuti sono stati disidratati in scala ascendente di etanolo e xilene, infiltrati e successivamente inclusi in Paraplast®. Sezioni seriate di 3  $\mu\text{m}$  sono state prodotte con microtomo rotativo e fissate su vetrini normali per la colorazione morfologica (ematossilina di Harris/eosina yellow) e su vetrini polilisinati HistoBond® + (Marienfeld-Superior, DE) per colorazione di Gram-Twort (Twort, 1924) e per immunoistochimica (IHC). L'identificazione IHC di antigeni di *V. harveyi* è stata sviluppata con siero policlonale prodotto in coniglio immunizzato contro *V. harveyi* (paragrafo 2.4) seguendo il protocollo IHC pubblicato da Mutinelli (et al., 1998) e aggiornato da Pascoli (et al., 2016). In dettaglio il siero policlonale scomplementato ( $+56^\circ\text{C}$  per 30 min) è stato utilizzato ad una diluizione 1:2000. Per valutare la specificità del siero policlonale il protocollo IHC è stato inoltre impiegato su campioni istologici contenenti congeneri di *V. harveyi*. In dettaglio porzioni di tessuto muscolare di trota sono stati infiltrati con brodocolture di 8 diverse specie di Vibrionaceae (*V. anguillarum* O1, *V. campbellii*, *V. rotiferianus*, *V. alginolyticus*, *V. vulnificus*, *V. scophthalmi*, *V. neptunius*, *P. damsela* subsp. *damsela*) incubati *overnight* a  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , fissati in formalina e processati come precedentemente riportato.

## 2.6 Sierologia

### 2.6.1 Standardizzazione di un protocollo ELISA indiretto

Un metodo ELISA indiretto è stato sviluppato per valutare la risposta anticorpale sierica elicitata nei branzini sottoposti a vaccinazione e/o infettati sperimentalmente con ceppi di *V. harveyi*.

Prove preliminari sono state eseguite basandosi sui risultati di ELISA indiretta sviluppati per *V. anguillarum* in branzino (Rampazzo, 2003). Un ceppo di *V. harveyi* ad elevata patogenicità impiegato nelle preparazioni vaccinali (Cp. VIII) è stato coltivato per 18 h in TSB 2% a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , centrifugato e risospeso in SF, inattivato con formaldeide (0,3%) per 24 h e nuovamente lavato in SF. Il pellet batterico è stato risospeso in tampone carbonato-bicarbonato a tre concentrazioni differenti ( $3 \times 10^3$  -  $3 \times 10^5$  -  $3 \times 10^7$  ufc/ml) e le sospensioni sono state distribuite in differenti piastre ELISA a fondo piatto da 96 pozzetti Maxisorp Immunoplate (100  $\mu\text{l}$  per pozzetto). L'adsorbimento dell'antigene è stato condotto a  $+4 \pm 2^\circ\text{C}$  overnight. Le piastre sono state lavate 3 volte con soluzione di lavaggio (PBS 0,01% + TWEEN 0,05%) ed il blocco dei siti aspecifici è stato eseguito con una soluzione di sieralbumina bovina BSA 3% in PBS per 30 minuti a  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ . Dopo 3 lavaggi sono stati distribuiti nei pozzetti i sieri di branzino incogniti presumibilmente positivi (vaccinati IP con adiuvante ed infettati IP con il ceppo batterico in esame) e sieri di branzini non vaccinati o esposti ad infezione con *V. harveyi* (controllo negativo). I sieri sono stati diluiti in PBS ad una diluizione iniziale 1:25 e diluizioni seriali per raddoppio (1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200). Le piastre sono state incubate per 1 ora a  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  e dopo 3 lavaggi è stato aggiunto nei pozzetti un siero anti-Ig di branzino prodotto *in-house* in coniglio (diluito 1:20.000 in PBS) incubato per 1 ora a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ . Dopo 3 lavaggi sono stati aggiunti 100  $\mu\text{l}$  di siero anti-IgG di coniglio coniugato con perossidasi di rabarbaro (Sigma-Aldrich) diluito 1:5000 in PBS ed incubato per 1 ora a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ . Dopo 3 lavaggi è stato aggiunto il cromogeno TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina) TMB Microwell Peroxidase (KPL, Gaithersburg, USA) e la reazione è stata condotta in agitazione per 5 min a  $T^\circ$  ambiente, producendo una soluzione di colore bluastro nei campioni positivi. La reazione enzima-substrato è stata bloccata con una soluzione di stop con acido solforico (100  $\mu\text{l}$  per pozzetto) facendo virare la soluzione al giallo. La lettura delle piastre è stata eseguita allo spettrofotometro (Sunrise™, Tecan) ad una lunghezza d'onda di 450 nm e i risultati sono stati espressi come densità ottica (DO). Per ciascuna piastra sono stati impiegati alcuni pozzetti in doppio per controlli negativi di processo: i) senza siero di branzino (sostituito con PBS) per valutare legami aspecifici del siero anti-Ig di branzino con l'antigene adsorbito; ii) senza siero di branzino e senza siero anti-Ig di branzino per valutare legami aspecifici del siero anti IgG di coniglio; iii) senza alcun reagente (solo PBS) per valutare la densità ottica dell'antigene adsorbito. I sieri in esame sono stati valutati come positivi con una assorbanza pari al doppio o superiore ai controlli negativi (siero negativo di branzino) per ciascuna diluizione analizzata.

## 2.6.2 Analisi dei sieri da prove di sicurezza ed efficacia vaccinale

Dopo aver standardizzato il metodo ELISA indiretto sono stati valutati i sieri prelevati da 20 esemplari di branzino vaccinati mediante inoculo IP addizionato o meno con adiuvante (*safety test*) e i sieri prelevati dai branzini sopravvissuti alla prova di *potency* vaccinale (2.3.4), analizzando circa 10 esemplari per ciascun gruppo. Sono stati inoltre testati dieci sieri prelevati da branzini inoculati con solo adiuvante Montanide™ 763 AVG (post 30 giorni) per valutare eventuali reazioni aspecifiche del siero in ELISA indotte dall'adiuvante stesso. Tutti i sieri sono stati sottoposti a scomplementazione mediante riscaldamento a +45°C per 30 min. Una prima analisi è stata condotta con adsorbimento su pozzetto di  $3 \times 10^7$  ufc/ml di *V. harveyi* (Cp. VIII) ed una diluizione dei sieri in esame a 1:100 in PBS. Successivamente i sieri positivi allo screening sono stati testati a diluizione successive (1:200; 1:400; 1:800), mentre i sieri dubbi sono stati testati a diluizione inferiore (1:25; 1:50).

### 3 RISULTATI

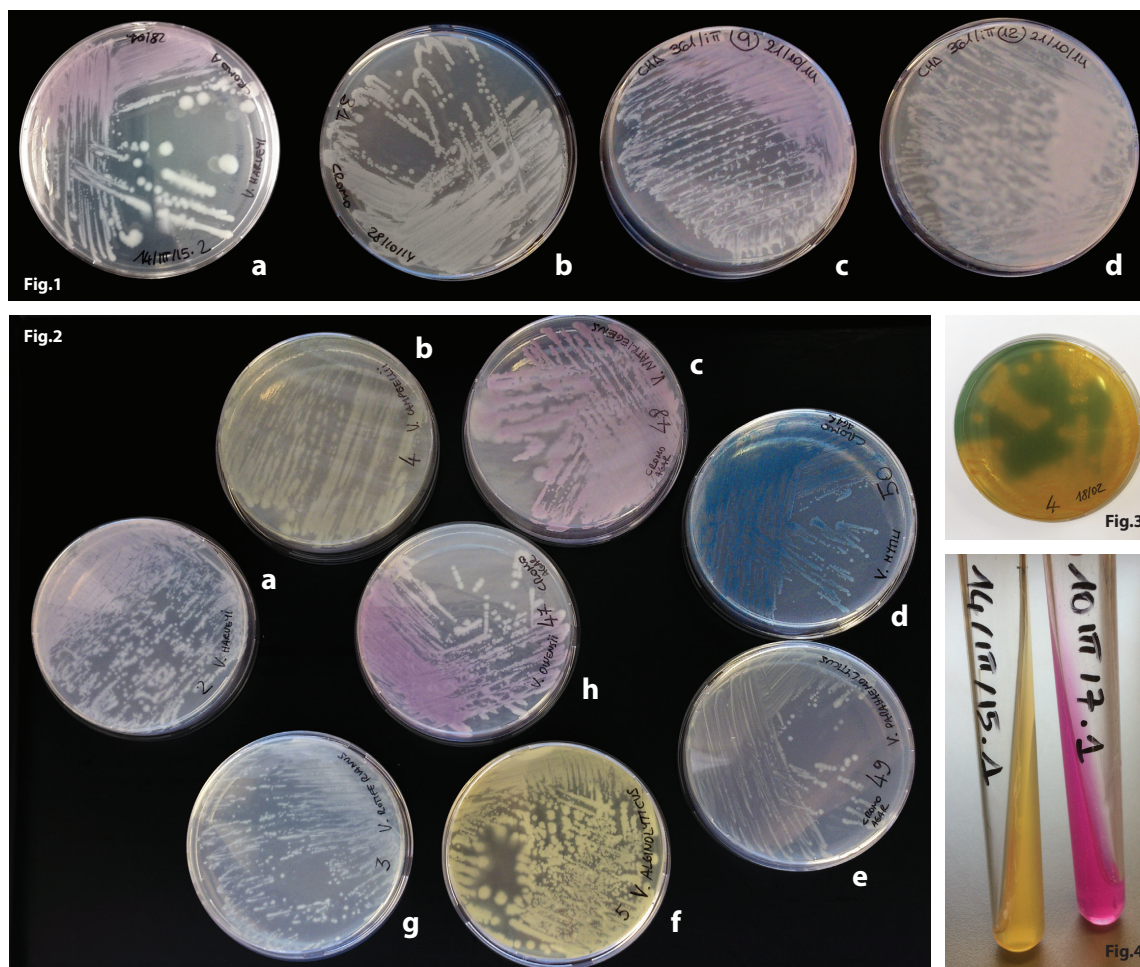
#### 3.1 BATTERIOLOGIA

##### 3.1.1 Identificazione fenotipica di *Vibrio harveyi*

Tutti gli isolati di *V. harveyi* analizzati hanno presentato reazione positiva al test di ossidasi e catalasi, test KOH, crescita in terreno MacConkey agar, evidenziando nei test in macrometodo metabolismo ossidativo e fermentativo, metabolismo del glucosio (KIA 2%NaCl), reazione positiva per indolo e motilità in SIM. Il 55% dei ceppi analizzati appaiono sciamanti in TSA 2% ma non in AS. Attività emolitica è stata evidenziata in AS circa nel 53% dei ceppi analizzati, in particolare  $\alpha$ -emolisi nel 18% dei ceppi a 24 ore di incubazione, nel 23% a 48 ore, nel 9% a 72 ore mentre il 3% ha evidenziato  $\beta$ -emolisi a 48 ore. La luminescenza è stata osservata nel 12% degli isolati. I ceppi hanno evidenziato crescita tra 22-37°C ma non a 41±1°C. Il test Vibriostatic O/129 ha evidenziato sensibilità alla concentrazione 150 µg nel 99% dei ceppi, mentre alla concentrazione 10 µg il 53% dei ceppi è apparso resistente. I risultati dell'identificazione fenotipica complessiva di tutti i ceppi batterici della ceppoteca sono riportati nell'Appendice B.

##### 3.1.1.1 Crescita in terreni selettivi e differenziali

La crescita in TCBS ha evidenziato la presenza di colonie gialle nel 98% degli isolati da specie ittiche. Nei ceppi isolati da molluschi bivalvi al contrario solo il 55% ha presentato fermentazione del saccarosio con viraggio al giallo delle colonie. La crescita su CHROMagar Vibrio™ ha evidenziato 5 colorazioni per *V. harveyi* (Tavola 3). Sono stati osservati numerosi ceppi bicolori in relazione alla densità delle colonie: dove le colonie apparivano più dense si presentavano rosa chiaro - Pantone 482 (40% dei ceppi), o lilla - Pantone 5235 (8%) mentre le colonie isolate apparivano bianche. Alcuni ceppi hanno evidenziato invece colonie monocolori: rosa chiaro (24%), lilla (7%) o bianco latte (20%).



**Tavola 3:** Terreni selettivi e differenziali:

**Fig. 1:** Ceppi di *V. harveyi* con pigmentazione differente su terreno differenziale CHROMagar Vibrio™ post 48 ore di coltivazione a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ : a) bicolore lilla e bianco; b) monocolor bianco; c) monocolor lilla; d) monocolor rosa chiaro. **Fig. 2:** Ceppi appartenenti al clade *Harveyi* su terreno differenziale CHROMagar Vibrio™ post 48 ore di coltivazione: a) *V. harveyi* LMG4044; b) *V. campbellii* CECT523; c) *V. natriegens* CECT526; d) *V. mytili* CECT632; e) *V. parahaemolyticus* ATCC17802 f) *V. alginolyticus* LMG4409; g) *V. rotiferianus* LMG21460; h) *V. owensii* LMG25443. **Fig. 3:** Colonie gialle di *V. harveyi* in terreno selettivo e differenziale TCBS post 24 ore di coltivazione a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ . **Fig. 4:** Crescita in Christensen Agar *slant* per la valutazione dell'enzima ureasi; il ceppo ureasi positivo determina viraggio cromatico al viola, mentre il ceppo negativo mantiene la colorazione gialla del terreno.

### 3.1.1.2 API20E

I risultati delle prove biochimiche effettuate in galleria miniaturizzata sono riportati per ciascun ceppo della ceppoteca in Appendice B, mentre nella Tabella 16 e Tavola 4 sono evidenziati i risultati per gli isolati di *V. harveyi*. In particolare i ceppi di *V. harveyi* isolati da teleostei, analizzati a 48 ore, hanno presentato elevata omogeneità nel metabolismo degli aminoacidi: enzima arginina deidrolasi (ADH) negativo, lisina decarbossilasi (LDC) positivo e ornitina decarbossilasi (ODC) positivo nel 93% dei ceppi analizzati. Il metabolismo del citrato (CIT) è apparso positivo virando in alcuni casi tardivamente (72 ore).  $\beta$ -galattosidasi, triptofano deaminasi, test di Voges-Proskauer appaiono

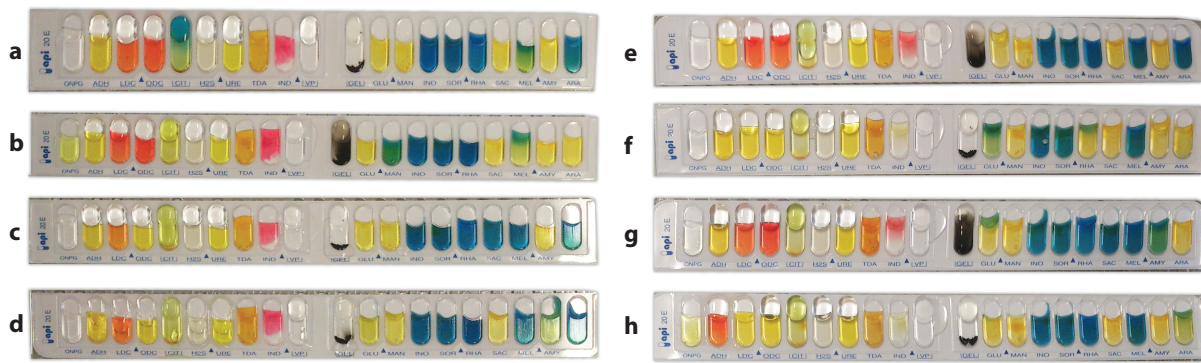
negativi, mentre la gelatinasi risulta generalmente positiva (84%) tardivamente (72h). Il metabolismo degli zuccheri presenta variabilità per sorbitolo (65% positivi) e saccarosio (98%), meno frequente per melibiosio e arabinosio. L'ureasi risulta negativa per il 96% dei ceppi, tuttavia prove eseguite in macrometodo (Christensen agar slant) hanno evidenziato una reazione positiva in una elevata percentuale di ceppi (16+/21 testati). I ceppi isolati da molluschi bivalvi (9 ceppi) hanno evidenziato una maggior variabilità presentando metabolismo del saccarosio positivo nel 55%, citrato positivo nel 67%, indolo positivo nel 67% e ornitina decarbossilasi positiva nel 67% (Tab. 16).

I codici numerici API 20E più frequenti sono stati 4346525 (48%), 4346125 (23%), 4344125 (9%).

ATTIVITÀ ENZIMATICA	API20E	RISULTATO Ceppi teleostei	RISULTATO Ceppi bivalvi	NOTE
β-galattosidasi	ONPG	- (100%)	- (100%)	
Arginina diidrolasi	ADH	- (100%)	- (100%)	
Lisina decarbossilasi	LDC	+ (100%)	+ (100%)	
Ornitina decarbossilasi	ODC	+ (94%)	+ (67%)	
Utilizzo del Citrato	CIT	+ (100%)	+ (67%)	Vira tardivamente (48-72h)
Produzione idrogeno solforato	H <sub>2</sub> S	- (100%)	- (100%)	
Ureasi	URE	- (96%)	- (100%)	Macro + (76%) (bivalvi 50%)
Triptofano deaminasi	TDA	- (99%)	- (100%)	
Indolo	IND	+ (99%)	+ (67%)	
Test di Voges-Proskauer	VP	- (100%)	- (100%)	
Gelatinasi	GEL	+ (84%)	+ (67%)	Vira tardivamente (48-72 h)
Fermentazione del Glucosio	GLU	+ (100%)	+ (100%)	
Fermentazione del Mannosio	MAN	+ (100%)	+ (100%)	
Fermentazione del Inositolo	INO	- (100%)	- (100%)	
Fermentazione del Sorbitolo	SOR	+ (60%)	- (89%)	
Fermentazione del Rhamnosio	RHA	- (100%)	- (89%)	
Fermentazione del Saccarosio	SAC	+ (95%)	+ (55%)	
Fermentazione del Melibiosio	MEL	- (98%)	- (100%)	
Fermentazione del Amygdalina	AMY	+ (100%)	+ (100%)	
Fermentazione del Arabinosio	ARA	- (99%)	- (100%)	

**Tabella 16:** Risultati delle prove biochimiche in micrometodo (API20E) eseguite su *V. harveyi* isolati da specie ittiche e da molluschi bivalvi





**Fig.1**



**Fig. 2**



**Fig. 3**

**Tavola 4:** Lettura delle gallerie miniaturizzate API<sup>®</sup>20E™.

**Fig. 1:** Prove biochimiche post 24 ore di coltivazione a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ : a) *V. harveyi* LMG4044; b) *V. rotiferianus* LMG21460; c) *V. campbelli* CECT523; d) *V. alginolyticus* LMG4409; e) *V. owensii* LMG25443; f) *V. natriegens* CECT526; g) *V. parahaemolyticus* ATCC17802; h) *V. mytili* CECT632. **Fig. 2:** Prove biochimiche post 48 ore di coltivazione a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  per *V. harveyi*: a) ceppo ureasi positivo; b) ceppo ureasi negativo. **Fig. 3:** Prove biochimiche post 48 ore di coltivazione a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  per *V. harveyi* isolati da bivalvi (*M. galloprovincialis*): a) ceppo negativo per ornitina decarbossilasi; b) ceppo negativo per citrato ed indolo.

### 3.1.2 Identificazione biomolecolare

#### 3.1.2.1 Amplificazione del gene *pyrH*

L'amplificazione del gene *pyrH* è stata ottenuta per tutti gli isolati di *V. harveyi* e per le specie della famiglia Vibrionaceae presenti nella ceppoteca ad eccezione di *P. damsela* subsp. *damsela*, *P. damsela* subsp. *piscicida* e *V. metschnikovii*. Il sequenziamento della porzione del gene *pyrH* (450 bp) ha permesso per ciascun ceppo batterico il confronto con le sequenze depositate nel database GenBank<sup>®</sup> e l'identificazione della specie con la maggior omologia di sequenza. Tutti i ceppi identificati fenotipicamente come *V. harveyi* hanno evidenziato omologia del 100% con le sequenze depositate di *V. harveyi* ATCC 14126 (EU118238.1); ATCC 33843 (CP009467.2); ATCC 43516 (CP014038.2). I ceppi delle altre specie di *Vibrio* acquistati da ceppoteche internazionali o ceppi di campo identificati fenotipicamente e mediante MALDI-TOF sono stati confermati con elevata omologia di sequenza alle specie corrispondenti. L'assegnazione di specie per ciascun ceppo è riportata nell'Appendice C.

### 3.1.2.2 Amplificazione del gene *toxR* specie-specifico

L'amplificazione della porzione del gene *toxR* mediante primer specie-specifici è stata condotta applicando inizialmente il protocollo termico proposto da Pang (et al., 2006) caratterizzato da una temperatura di annealing dei primer di 55°C. Nelle prove di specificità della metodica, analizzando il DNA estratto delle altre specie di *Vibrio* presenti nella ceppoteca, si è evidenziato nella corsa elettroforetica la presenza di bande aspecifiche di peso molecolare superiore rispetto all'atteso (Tav. 5, Fig. 1). Per eliminare queste amplificazioni aspecifiche che potevano compromettere la semplicità di lettura della metodica sono state apportate delle variazioni al profilo termico incrementando progressivamente la temperatura di appaiamento dei primer (annealing a 57 – 59 – 60 – 61°C) (Tav. 5, Fig. 2-3). L'aumento della temperatura di annealing a 61°C ha permesso di ridurre drasticamente le amplificazioni aspecifiche in tutte le specie di *Vibrio* analizzate mantenendo al contempo una efficiente amplificazione dei ceppi di *V. harveyi*. Unicamente due specie del clade *Harveyi* (*V. rotiferianus* LMG 21460; *V. owensii* LMG 25443) e la specie *V. gigantis* hanno evidenziato anche a 61°C la presenza di amplificato, tuttavia le dimensioni della banda rilevabile in elettroforesi pari a circa 600 bp sono chiaramente distinguibili da quella della specie target *V. harveyi* di 382 bp (Tav. 5, Fig. 3). Tutti i ceppi della collezione identificati come *V. harveyi* sono risultati positivi all'amplificazione del gene *toxR* mentre le altre specie della famiglia Vibrionaceae sono risultate negative; i risultati sono riportati in Allegato 3. Alcuni amplificati ottenuti da *V. harveyi* sono stati sequenziati confermando l'omologia con sequenze di *V. harveyi* depositate in GenBank® (JF930599.1-FM202678.1).

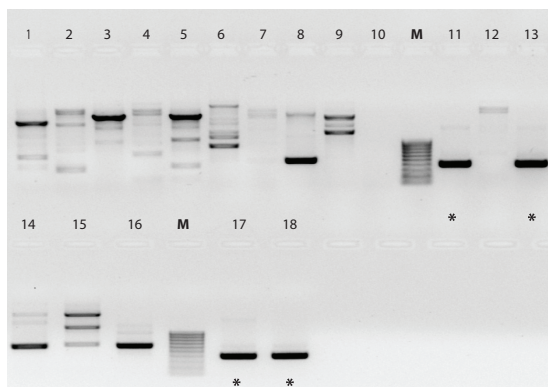


Fig.1

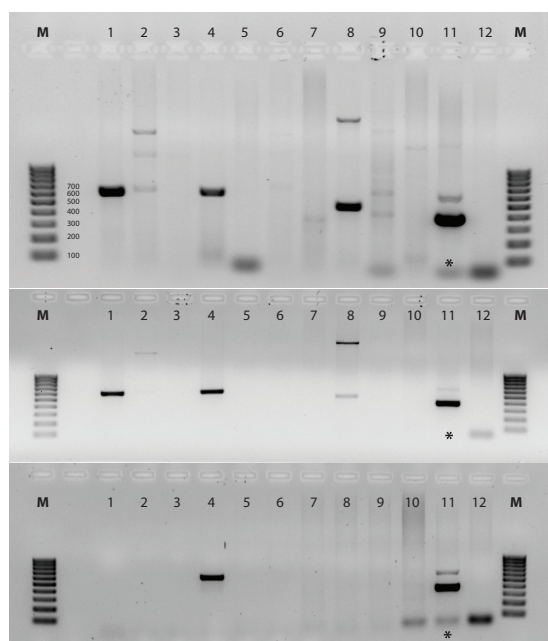


Fig.2

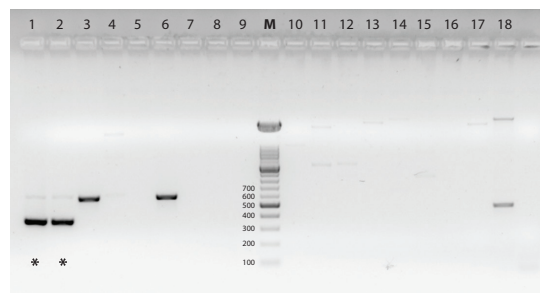


Fig.3

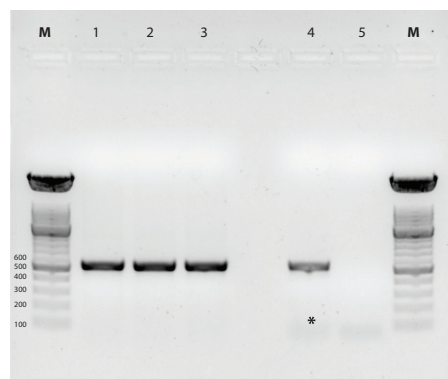
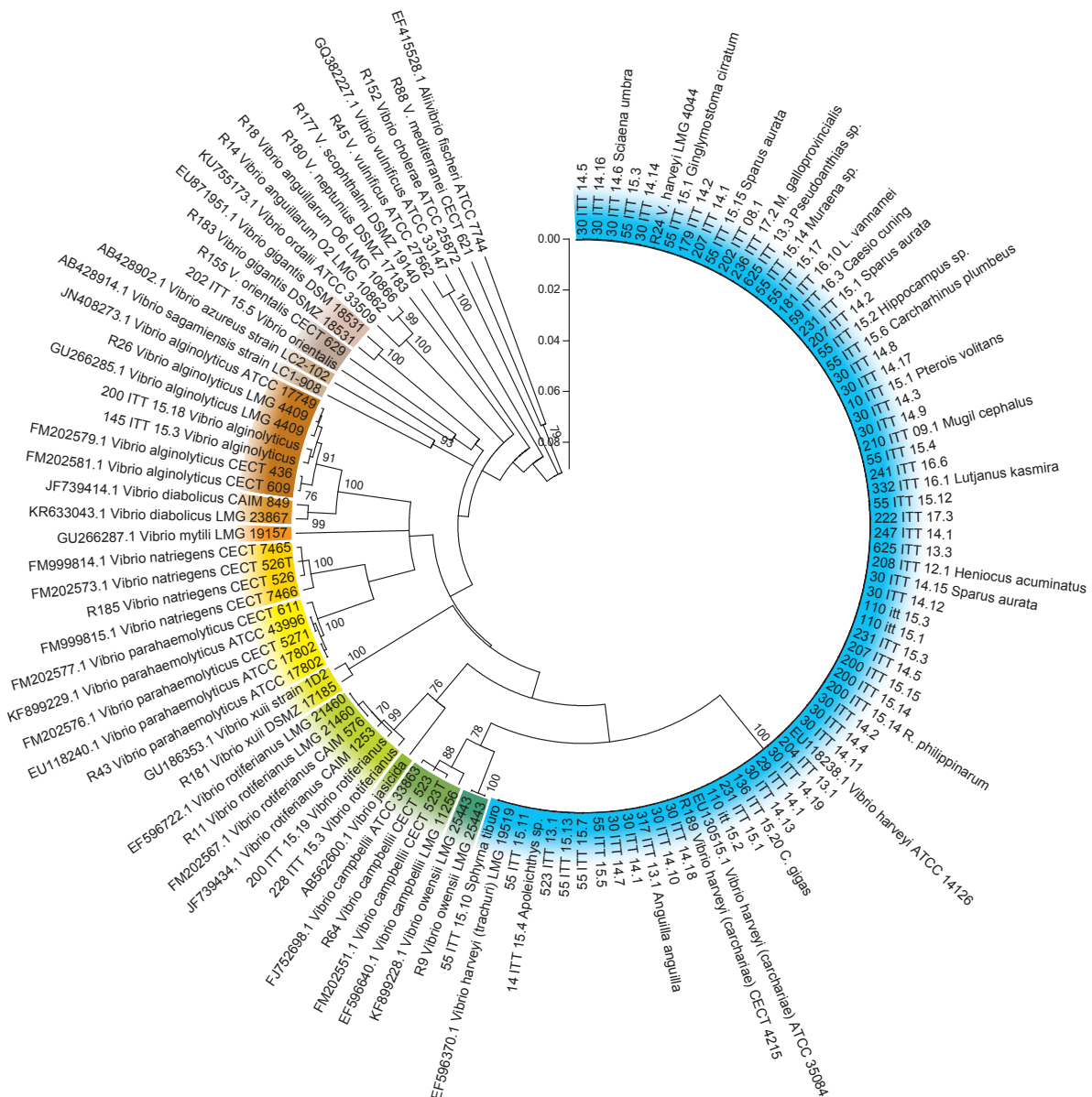


Fig.4

**Tavola 5:** Gel elettroforetici degli amplificati del gene *toxR* e del gene *pyrH*; i campioni corrispondenti a *V. harveyi* sono evidenziati con asterisco (\*). **Fig. 1:** Corsa elettroforetica di amplificati del gene *toxR* ottenuti con profilo termico secondo Pang (et al., 2006) con *annealing* dei primer a 55°C. Caricamento dei pozzetti: 1) *V. anguillarum* O1 LMG10861 ; 2) *V. anguillarum* O6 LMG10866 ; 3) *P. damsela* subsp. piscicida ATCC17911; 4) *P. damsela* subsp. *damsela* NCIMB 13351; 5) *P. damsela* subsp. *damsela* NCIBM2182 ; 6) *V. cholerae* ATCC25872; 7) *V. xuii* DSMZ17185; 8) *V. gigantis* DSMZ18531; 9) *V. metschnikovii* CECT 5070; 10) controllo negativo di amplificazione; M) Marker (Molecular ruler 100 bp – Bio-Rad); 11) *V. harveyi* CECT4215; 12) *V. alginolyticus* LMG4409; 13) *V. harveyi* LMG4044; 14) *V. rotiferianus* LMG21460; 15) *V. campbellii* CECT523; 16) *V. owensii* LMG25443; 17) *V. harveyi* LMG4044; 18) *V. harveyi* CECT4215. **Fig. 2:** Prove comparative di amplificazione con temperature di *annealing* dei primer progressivamente crescenti: a) *annealing* a 57°C; b) *annealing* a 59°C; c) *annealing* a 60°C. Caricamento dei pozzetti: M) Marker (Molecular Ruler 100 bp – Bio-Rad); 1) *V. rotiferianus* LMG21460; 2) *V. campbellii* CECT523; 3) *V. alginolyticus* LMG4409; 4) *V. owensii* LMG25443; 5) *V. natriegens* CECT526; 6) *V. parahaemolyticus* ATCC17802; 7) *V. mytili* CECT632; 8) *V. gigantis* DSMZ18531; 9) *V. anguillarum* O2 LMG10862; 10) *V. ordalii* CECT582; 11) *V. harveyi* LMG4044; 12) controllo negativo di amplificazione. **Fig. 3:** Amplificazione del gene *toxR* con *annealing* a 61°C. Caricamento dei pozzetti: 1) *V. harveyi* CECT4215; 2) *V. harveyi* LMG4044; 3) *V. rotiferianus* LMG21460; 4) *V. campbellii* CECT523; 5) *V. alginolyticus* LMG4409; 6) *V. owensii* LMG25443; 7) *V. natriegens* CECT526; 8) *V. parahaemolyticus* ATCC17802; 9) *V. mytili* CECT632; M) Marker (Molecular Ruler 100 bp – Bio-Rad); 10) *V. ordalii* CECT582; 11) *V. diabolicus* LMG23867 ; 12) *P. damsela* subsp. piscicida ATCC17911; 13) *P. damsela* subsp. *damsela* NCIBM2182; 14) *V. cholerae* ATCC25872; 15) *V. xuii* DSMZ17185; 16) *V. metschnikovii* CECT 5070; 17) *V. anguillarum* O2 LMG10862; 18) *V. gigantis* DSMZ18531. **Fig. 4:** Corsa elettroforetica di amplificati del gene *pyrH*. Caricamento pozzetti: M) Marker (Molecular Ruler 100 bp – Bio-Rad); 1) *V. rotiferianus* LMG21460; 2) *V. campbellii* CECT523; 3) *V. alginolyticus* LMG4409; 4) *V. harveyi* LMG4044; 5) controllo negativo di amplificazione.

### 3.1.2.3 Analisi filogenetica

Le sequenze ottenute dall'amplificazione di una porzione del gene *pyrH* di tutti gli isolati di *V. harveyi* e dei ceppi di riferimento delle altre specie di *Vibrio* della ceppoteca sono state allineate includendo dove possibile almeno 2 sequenze depositate nel database Genbank® per specie batterica. L'analisi filogenetica condotta mediante metodo Neighbour-Joining ha permesso di ottenere un albero filogenetico dove tutti gli isolati identificati come *V. harveyi* da analisi fenotipica e MALDI-TOF formavano un raggruppamento (*cluster*) chiaramente separato dalle altre specie più filogeneticamente simili (Tavola 6).



**Tavola 6:** Albero filogenetico ottenuto dall'analisi Neighbour-Joining delle sequenze del gene *pyrH*. In azzurro sono evidenziate le sequenze della specie *V. harveyi*; le specie appartenenti al clade *Harveyi* secondo Sawabe (et al., 2013) sono evidenziate con verde, giallo e bruno. In grigio sono evidenziate altre specie filogeneticamente prossime al clade *Harveyi*. I numeri riportati sui nodi si riferiscono ai valori di Bootstrap; sono riportati solo valori  $\geq 70$ . La lunghezza dei rami è proporzionale al numero di sostituzioni nucleotidiche per sito.

### 3.1.3 Identificazione proteomica

I risultati dell'assegnazione MALDI-TOF ed il punteggio ottenuto (*score*) sono riportati nell'Appendice C. L'identificazione ottenuta comparando gli spettri pmf degli isolati della ceppoteca assegnati fenotipicamente e genotipicamente alla specie *V. harveyi* è stata coerente attribuendo come *best match* la specie *V. harveyi* per tutti i ceppi isolati da specie ittiche. Il punteggio di attribuzione alla specie è stato > 2,300 per il 91% dei ceppi esaminati (identificazione di specie certa), pari a 2,250 per il 4% dei ceppi e > 2,000 per il 5% (identificazione di specie probabile). L'identificazione dei ceppi isolati in molluschi bivalvi ha evidenziato performance inferiori. Per 2 isolati su 9 l'assegnazione *best match* è stata data alla specie *V. campbellii* (score 2,33) e secondo *best match* a *V. harveyi* (score 2,29); mentre un isolato in *C. gigas* ha ottenuto il punteggio di assegnazione più basso (2,090) alla specie *V. harveyi*. Questi ceppi con identificazione dubbia tramite MALDI-TOF hanno tuttavia evidenziato caratteristiche fenotipiche atipiche come crescita su TCBS verde, reazione per indolo e citrato negativo in micrometodo o ODC negativo e metabolismo del rhamnosio positivo. I ceppi analizzati delle altre specie di *Vibrio* e *Photobacterium*, sia ceppi di referenza che ceppi di campo, hanno evidenziato complessivamente una corretta identificazione con punteggi > 2,300.

### 3.1.4 Valutazione dell'antibiotico-resistenza

#### 3.1.4.1 Antibiogrammi mediante diffusione (test Kirby-Bauer)

I risultati della lettura degli aloni di inibizione è riportata per i ceppi di *V. harveyi* in Tabella 17.

	IDENTIFICAZIONE DEL CEPPLO BATTERICO				METODO KIRBY-BAUER						
	Codice identificativo	Anno di isolamento	Provenienza	Specie	Ampicillina	Enrofloxacinina	Florfenicolo	Flumequina	Sulfamidico+ Trimethoprim	Tetraciclina	Ossitetraciclina
ALLEVATI	202/ITT/08.1	2008	Adriatico	<i>D. labrax</i>	R	I	S	S	S	S	nd
	180/ITT/08	2008	Adriatico	<i>D. labrax</i>	R	I	S	S	S	S	nd
	30/ITT/14.4	2010	Adriatico	<i>D. labrax</i>	R	I	S	S	S	S	S
	30/ITT/14.2	2011	Tirreno	<i>D. labrax</i>	R	I	S	S	S	S	nd
	30/ITT/14.13	2011	Tirreno	<i>D. labrax</i>	R	S	S	S	S	S	S
	30/ITT/14.16	2011	Adriatico	<i>D. labrax</i>	R	I	S	S	S	S	nd
	30/ITT/14.3	2012	Tirreno	<i>D. labrax</i>	R	S	S	S	S	S	S
	30/ITT/14.14	2012	Mar Ligure	<i>D. labrax</i>	R	S	S	S	S	S	S
	30/ITT/14.10	2013	Tirreno	<i>D. labrax</i>	R	S	S	S	S	S	S
	30/ITT/14.11	2013	Mar Ligure	<i>D. labrax</i>	R	S	S	S	S	S	S
	30/ITT/14.7	2013	Canale di Sicilia	<i>D. labrax</i>	R	S	S	S	S	S	nd
	523/ITT/13.1	2013	Tirreno	<i>D. labrax</i>	R	I	R	S	R	R	R
	55/ITT/15.8	2014	Ionio	<i>D. labrax</i>	R	I	S	S	S	S	S
	207/ITT/14.5	2014	Tirreno	<i>D. labrax</i>	R	I	S	S	S	S	nd
	55/ITT/15.3	2014	Adriatico Orientale	<i>D. labrax</i>	R	I	S	S	S	S	nd
	55/ITT/15.17	2014	Canale di Sicilia	<i>D. labrax</i>	R	I	S	S	S	S	S
	55/ITT/15.4	2014	Adriatico	<i>D. labrax</i>	R	R	S	S	S	S	S
	55/ITT/15.12	2014	Tirreno	<i>D. labrax</i>	R	S	S	S	S	S	nd
	247/ITT/14.1	2014	Mar Ligure	<i>D. labrax</i>	R	S	S	S	S	S	nd
	55/ITT/15.16	2014	Tirreno	<i>D. labrax</i>	R	I	S	S	S	S	nd
	110/ITT/15.2	2015	Mar Egeo - Creta	<i>D. labrax</i>	R	I	S	S	I	S	nd
	55/ITT/15.7	2015	Tirreno	<i>D. labrax</i>	R	I	S	S	S	S	nd
	110/ITT/15.3	2015	Mar Egeo - Creta	<i>D. labrax</i>	R	S	S	S	S	S	S
	26/ITT/16.14	2016	Turchia	<i>D. labrax</i>	R	S	S	S	S	S	R
	200/ITT/17.4	2017	Tirreno	<i>D. labrax</i>	R	I	S	S	S	S	S
	222/ITT/17.3	2017	Acquario IZSve	<i>D. labrax</i>	R	I	S	S	S	S	nd
421/ITT/17.1	2017	Mediterraneo - Malta	<i>D. labrax</i>	R	I	S	S	S	S	S	
55/ITT/15.15	2014	Adriatico	<i>S. aurata</i>	R	S	S	S	S	S	nd	
231/ITT/15.1	2015	Adriatico	<i>S. aurata</i>	I	I	S	S	S	S	S	
300/ITT/16.2	2016	Mar Ligure	<i>S. aurata</i>	R	S	S	S	S	S	I	
ORNAMENTALI	R189 CECT 4215	-	-	<i>C. plumbeus</i>	R	I	S	S	S	S	nd
	208/ITT/12.1	2012	Acquario pubblico	<i>H. acuminatus</i>	R	S	S	S	S	S	S
	625/ITT/13.3	2013	Acquario pubblico	<i>P. squamipinnis</i>	R	R	S	I	S	S	nd
	14/ITT/15.4	2015	Acquario privato	<i>A. xanthurus</i>	R	R	S	S	S	S	nd
	10/ITT/15.1	2015	Acquario pubblico	<i>P. volitans</i>	R	S	S	S	S	S	nd
	332/ITT/16.1	2016	Acquario pubblico	<i>L. kasmira</i>	R	I	S	S	S	S	S
	59/ITT/16.3	2016	Acquario pubblico	<i>C. cuning</i>	R	R	S	I	S	S	nd
	106/ITT/16.19	2016	Acquario pubblico	<i>H2O</i>	R	R	S	I	S	S	nd
	181/ITT/16.10	2016	Allevamento RAS	<i>L. vannamei</i>	R	I	S	S	S	S	S
	241/ITT/16.6	2016	Allevamento RAS	<i>H2O</i>	R	I	S	S	S	S	nd
96/ITT/16.24	2016	Acquario pubblico	<i>H2O</i>	R	I	S	S	S	S	nd	
AMBIENTALI	R24 LMG4044	-	-	Anfipode	R	S	S	S	S	S	nd
	236/ITT/12.2	2012	Adriatico	<i>Mytilus sp.</i>	R	I	S	S	S	S	nd
	200/ITT/15.14	2015	Adriatico	<i>R. philippinarum</i>	R	I	S	S	S	S	nd
	136/ITT/15.20	2015	Adriatico	<i>C. gigas</i>	R	S	S	S	S	S	nd
	200/ITT/15.15	2015	Adriatico	<i>R. philippinarum</i>	R	S	S	S	S	S	S
	326/ITT/17.2	2017	Adriatico	<i>R. philippinarum</i>	R	I	S	S	S	S	S
	33/ITT/18.27	2017	Mar Ligure	<i>Mytilus sp.</i>	R	I	S	S	S	S	I
	33/ITT/18.21	2017	Mar Ligure	<i>Mytilus sp.</i>	R	S	S	S	S	S	S
33/ITT/18.25	2017	Mar Ligure	<i>Mytilus sp.</i>	R	S	S	S	S	S	S	

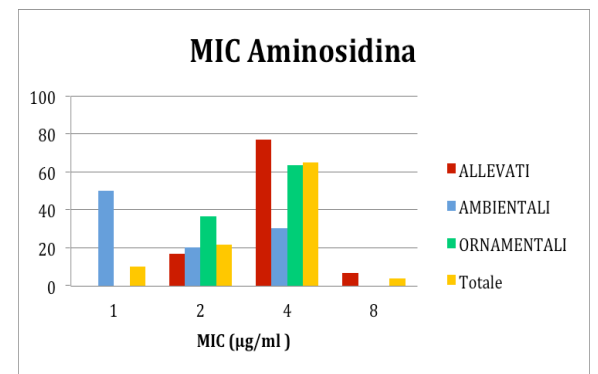
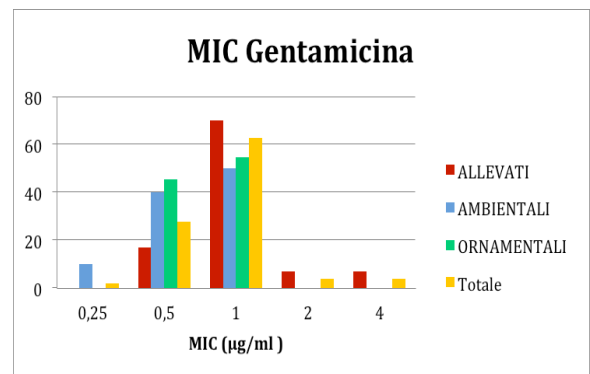
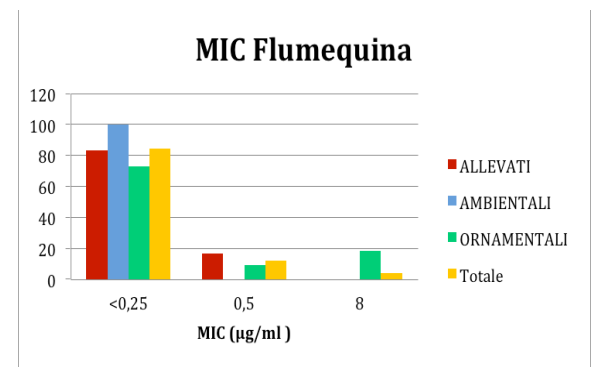
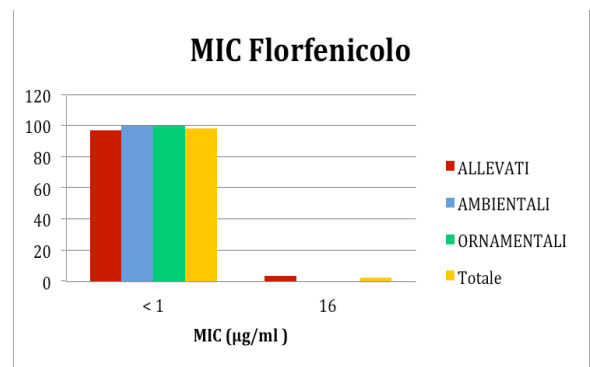
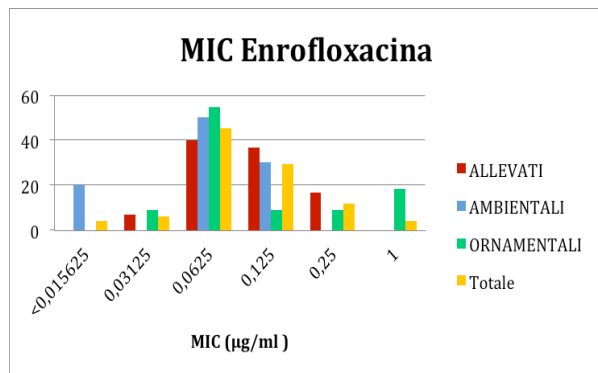
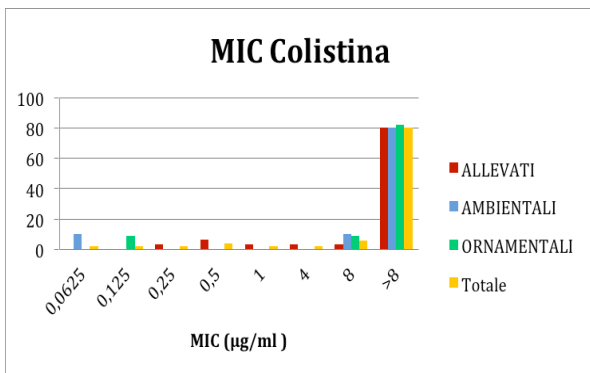
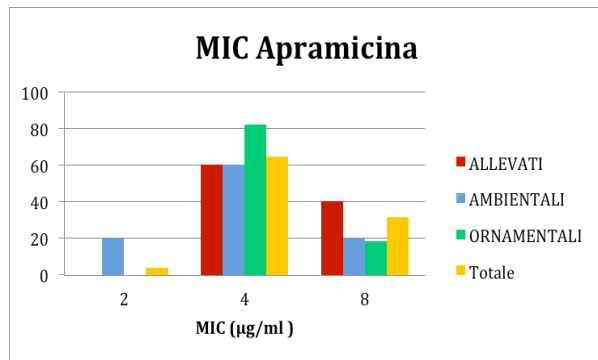
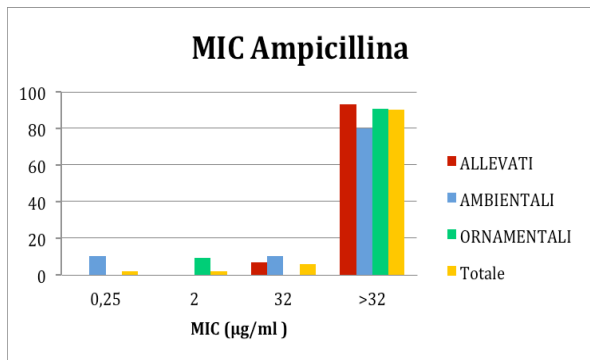
**Tabella 17:** Valutazione dell'antibiotico-resistenza mediante diffusione (Kirby-Bauer). Ciascun ceppo analizzato è stato valutato come resistente (R), intermedio (I) o sensibile (S) per ciascun antibiotico testato; nd: non determinato. I ceppi di *V. harveyi* sono raggruppati in base all'origine dell'ospite di isolamento.

### 3.1.4.2 Microdiluzione in brodo (MIC)

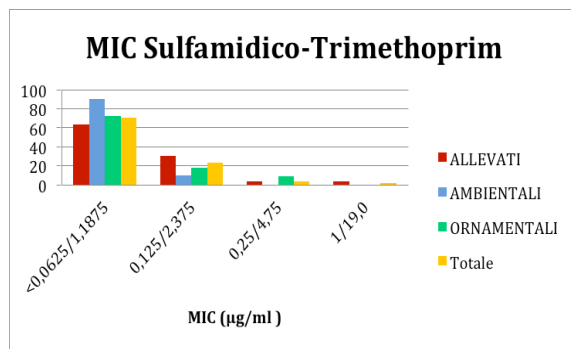
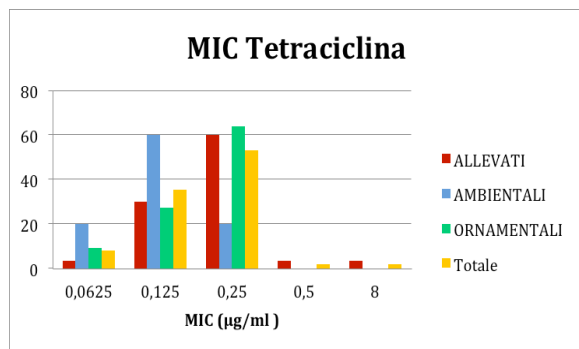
I risultati ottenuti per ciascun ceppo in esame sono riportati in sono in Tabella 18; i valori di MIC sono riportati per ciascun antibiotico negli istogrammi (Grafico 1) evidenziando le diverse origini dei ceppi analizzati (allevati, ambientali, ornamentali). I valori calcolati di MIC<sub>50</sub> e MIC<sub>90</sub> distinti in base all'origine dei ceppi sono riportati nella Tabella 19.

IDENTIFICAZIONE DEL CEPPPO BATTERICO					MIC (µg/ml)									
Codice identificativo	Anno	Provenienza	Specie		Ampicillina	Enrofloxacin	Florfenicolo	Flumequina	Sulfamidico + Trimethoprim	Tetraciclina	Colistina	Gentamicina	Aminosidina	Apramicina
ALLEVATI	202/ITT/08.1	2008	Adriatico	<i>D. labrax</i>	>32	0,125	<1	<0,25	<0,0625/1,1875	0,125	>8	1	4	4
	180/ITT/08	2008	Adriatico	<i>D. labrax</i>	>32	0,25	<1	0,5	<0,0625/1,1875	0,125	>8	1	4	4
	30/ITT/14.4	2010	Adriatico	<i>D. labrax</i>	>32	0,0625	<1	<0,25	<0,0625/1,1875	0,125	>8	1	4	8
	30/ITT/14.2	2011	Tirreno	<i>D. labrax</i>	>32	0,0625	<1	<0,25	<0,0625/1,1875	0,125	>8	0,5	4	4
	30/ITT/14.13	2011	Tirreno	<i>D. labrax</i>	>32	0,125	<1	0,5	<0,0625/1,1875	0,25	>8	1	4	8
	30/ITT/14.16	2011	Adriatico	<i>D. labrax</i>	32	0,03125	<1	<0,25	<0,0625/1,1875	0,0625	4	1	4	4
	30/ITT/14.3	2012	Tirreno	<i>D. labrax</i>	>32	0,125	<1	<0,25	0,125/2,375	0,25	8	1	4	8
	30/ITT/14.14	2012	Mar Ligure	<i>D. labrax</i>	>32	0,125	<1	<0,25	<0,0625/1,1875	0,25	>8	1	4	8
	30/ITT/14.10	2013	Tirreno	<i>D. labrax</i>	>32	0,0625	<1	<0,25	<0,0625/1,1875	0,25	>8	1	4	8
	30/ITT/14.11	2013	Mar Ligure	<i>D. labrax</i>	>32	0,125	<1	<0,25	0,125/2,375	0,25	>8	2	8	8
	30/ITT/14.7	2013	Canale di Sicilia	<i>D. labrax</i>	>32	0,0625	<1	<0,25	<0,0625/1,1875	0,25	>8	0,5	4	4
	523/ITT/13.1	2013	Tirreno	<i>D. labrax</i>	>32	0,0625	16	<0,25	1/19,0	8	0,25	1	4	4
	55/ITT/15.8	2014	Ionio	<i>D. labrax</i>	>32	0,25	<1	0,5	0,125/2,375	0,25	>8	0,5	4	8
	207/ITT/14.5	2014	Tirreno	<i>D. labrax</i>	>32	0,03125	<1	<0,25	<0,0625/1,1875	0,25	>8	1	2	4
	55/ITT/15.3	2014	Adriatico Orientale	<i>D. labrax</i>	>32	0,0625	<1	<0,25	0,125/2,375	0,25	>8	4	8	8
	55/ITT/15.17	2014	Canale di Sicilia	<i>D. labrax</i>	>32	0,0625	<1	<0,25	<0,0625/1,1875	0,125	0,5	1	4	8
	55/ITT/15.4	2014	Adriatico	<i>D. labrax</i>	>32	0,25	<1	<0,25	0,125/2,375	0,25	>8	1	4	4
	55/ITT/15.12	2014	Tirreno	<i>D. labrax</i>	>32	0,0625	<1	<0,25	<0,0625/1,1875	0,125	0,5	0,5	2	4
	247/ITT/14.1	2014	Mar Ligure	<i>D. labrax</i>	>32	0,125	<1	0,5	0,125/2,375	0,25	>8	1	4	4
	55/ITT/15.16	2014	Tirreno	<i>D. labrax</i>	>32	0,0625	<1	<0,25	<0,0625/1,1875	0,125	1	1	4	4
	110/ITT/15.2	2015	Mar Egeo - Creta	<i>D. labrax</i>	>32	0,25	<1	<0,25	0,25/4,75	0,25	>8	1	4	8
	55/ITT/15.7	2015	Tirreno	<i>D. labrax</i>	32	0,0625	<1	<0,25	0,125/2,375	0,25	>8	4	4	4
	110/ITT/15.3	2015	Mar Egeo - Creta	<i>D. labrax</i>	>32	0,0625	<1	<0,25	<0,0625/1,1875	0,125	>8	2	2	4
	26/ITT/16.14	2016	Turchia	<i>D. labrax</i>	>32	0,0625	<1	<0,25	0,125/2,375	0,25	>8	0,5	2	4
	200/ITT/17.4	2017	Tirreno	<i>D. labrax</i>	>32	0,125	<1	<0,25	<0,0625/1,1875	0,125	>8	1	4	4
	222/ITT/17.3	2017	Acquario IZSve	<i>D. labrax</i>	>32	0,125	<1	<0,25	<0,0625/1,1875	0,25	>8	1	4	4
	421/ITT/17.1	2017	Malta	<i>D. labrax</i>	>32	0,25	<1	0,5	0,125/2,375	0,25	>8	1	4	8
	55/ITT/15.15	2014	Adriatico	<i>S. aurata</i>	>32	0,125	<1	<0,25	<0,0625/1,1875	0,5	>8	1	2	4
	231/ITT/15.1	2015	Adriatico	<i>S. aurata</i>	>32	0,125	<1	<0,25	<0,0625/1,1875	0,25	>8	1	4	4
	300/ITT/16.2	2016	Mar Ligure	<i>S. aurata</i>	>32	0,125	<1	<0,25	<0,0625/1,1875	0,25	>8	1	4	8
ORNAMENTALI	R189 CECT 4215			<i>C. plumbeus</i>	>32	0,0625	<1	<0,25	<0,0625/1,1875	0,25	>8	0,5	4	4
	208/ITT/12.1	2012	Acquario pubblico	<i>H. acuminatus</i>	>32	0,0625	<1	<0,25	<0,0625/1,1875	0,25	>8	1	4	8
	625/ITT/13.3	2013	Acquario pubblico	<i>P. squamipinnis</i>	>32	0,125	<1	<0,25	0,25/4,75	0,25	>8	1	4	8
	14/ITT/15.4	2015	Acquario privato	<i>A. xanthurus</i>	>32	0,25	<1	0,5	0,125/2,375	0,25	>8	1	4	4
	10/ITT/15.1	2015	Acquario pubblico	<i>P. volitans</i>	>32	0,03125	<1	<0,25	<0,0625/1,1875	0,0625	0,125	0,5	2	4
	332/ITT/16.1	2016	Acquario pubblico	<i>L. kasmira</i>	2	0,0625	<1	<0,25	<0,0625/1,1875	0,125	>8	0,5	2	4
	59/ITT/16.3	2016	Acquario pubblico	<i>C. cuning</i>	>32	1	<1	8	<0,0625/1,1875	0,125	>8	1	4	4
	106/ITT/16.19	2016	Acquario pubblico	H2O	>32	1	<1	8	<0,0625/1,1875	0,25	>8	0,5	2	4
	181/ITT/16.10	2016	Allevamento RAS	<i>L. vannamei</i>	>32	0,0625	<1	<0,25	<0,0625/1,1875	0,125	>8	0,5	4	4
	241/ITT/16.6	2016	Allevamento RAS	H2O	>32	0,0625	<1	<0,25	0,125/2,375	0,25	>8	1	4	4
96/ITT/16.24	2016	Acquario pubblico	H2O	>32	0,0625	<1	<0,25	<0,0625/1,1875	0,25	8	1	2	4	
AMBIENTALI	R24 LMG4044		Acque libere	Anfipode	0,25	<0,015625	<1	<0,25	<0,0625/1,1875	0,0625	0,0625	0,25	1	2
	236/ITT/12.2	2012	Adriatico	<i>Mytilus sp.</i>	>32	0,0625	<1	<0,25	<0,0625/1,1875	0,125	>8	0,5	2	4
	200/ITT/15.14	2015	Adriatico	<i>R. philippinarum</i>	>32	0,0625	<1	<0,25	<0,0625/1,1875	0,125	8	1	2	4
	136/ITT/15.20	2015	Adriatico	<i>C. gigas</i>	32	<0,015625	<1	<0,25	<0,0625/1,1875	0,0625	>8	0,5	1	2
	200/ITT/15.15	2015	Adriatico	<i>R. philippinarum</i>	>32	0,125	<1	<0,25	0,125/2,375	0,25	>8	1	4	8
	326/ITT/17.2	2017	Adriatico	<i>R. philippinarum</i>	>32	0,0625	<1	<0,25	<0,0625/1,1875	0,125	>8	1	4	4
	33/ITT/18.27	2017	Mar Ligure	<i>Mytilus sp.</i>	>32	0,125	<1	<0,25	<0,0625/1,1875	0,125	>8	1	4	8
	33/ITT/18.16	2017	Mar Ligure	<i>Mytilus sp.</i>	>32	0,125	<1	<0,25	<0,0625/1,1875	0,25	>8	1	1	4
	33/ITT/18.21	2017	Mar Ligure	<i>Mytilus sp.</i>	>32	0,0625	<1	<0,25	<0,0625/1,1875	0,125	>8	0,5	1	4
33/ITT/18.25	2017	Mar Ligure	<i>Mytilus sp.</i>	>32	0,0625	<1	<0,25	<0,0625/1,1875	0,125	>8	0,5	1	4	

**Tabella 18:** Valutazione della minima concentrazione inibente mediante microdiluzione in brodo. Per ciascun ceppo sono indicati i valori di MIC espressi in µg/ml per ciascun antibiotico testato. I ceppi di *V. harveyi* sono raggruppati in base all'origine dell'ospite di isolamento.







**Grafico 1:** Distribuzione percentuale dei ceppi secondo i valori di MIC identificati per ciascuna molecola antibiotica, distinti in base all'origine dell'isolamento (allevati, ornamentali ed ambientali).

ANTIBIOTICO	CEPPI DI <i>V. HARVEYI</i>							
	ALLEVATI (n=30)		AMBIENTALI (n=10)		ORNAMENTALI (n=11)		COMPLESSIVO (n=51)	
	MIC50	MIC90	MIC50	MIC90	MIC50	MIC90	MIC50	MIC90
AMPICILLINA	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32
APRAMICINA	4	8	4	8	4	8	4	8
COLISTINA	>8	>8	>8	>8	>8	>8	>8	>8
ENROFLOXACINA	0,125	0,25	0,0625	0,125	0,0625	1	0,0625	0,25
FLORFENICOLO	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
FLUMEQUINA	<0,25	0,5	<0,25	<0,25	<0,25	8	<0,25	0,5
GENTAMICINA	1	2	0,5 (0,75*)	1	1	1	1	1
AMINOSIDINA	4	4	1 (1,5*)	4	4	4	4	4
TETRACICLINA	0,25	0,25	0,125	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
SULFAMETOSSAZOLO - TRIMETHOPRIM	<0,0625/1,1875	0,125/2,375	<0,0625/1,1875	<0,0625/1,1875 (0,656/1,7812*)	<0,0625/1,1875	0,125/2,375	<0,0625/1,1875	0,125/2,375

**Tabella 19:** Valori di MIC<sub>50</sub> e MIC<sub>90</sub> espressi in µg/ml calcolati per le diverse origini dei ceppi di *V. harveyi*. Con asterisco (\*) viene indicato il valore calcolato statisticamente che non è presente tra le concentrazioni effettive della micropiastra Micronauts-S.

## 3.2 PROVE DI INFEZIONE IN BRANZINO

### 3.2.1 Infezione mediante inoculo IP (pre-challenge)

L'infezione sperimentale eseguita per inoculo IP in esemplari sub-adulti (150-250 g) ha evidenziato per 8 ceppi batterici su 10 testati mortalità del 100% nell'arco di 16 ore. Esemplari infettati con ceppo X hanno riportato mortalità del 50% a 48 ore e 63 % a 96 ore (5/8), mentre il gruppo infettato con ceppo V non ha evidenziato mortalità nell'arco di 21 giorni. Nei branzini che hanno presentato mortalità iperacuta non è stato possibile valutare lo sviluppo dei segni clinici mentre per il ceppo X i branzini preagonici hanno evidenziato inscurimento della livrea (Tav.7, Fig. a) ed iperventilazione circa 2 ore prima di giungere a morte con dilatazione degli opercoli. Gli esemplari con mortalità iperacuta presentavano facies asfittica (63-88%, variabile tra i diversi ceppi) ed esternamente evidenziavano arrossamenti e soffiusioni emorragiche sul ventre ed alla base della pinna dorsale ed anale (Tav.7, Fig. b-c). Le branchie apparivano generalmente brunastre ed i filamenti branchiali presentavano apici anemici o giallastri. L'esame della cavità celomatica evidenziava liquido ascitico sieroso, raramente emorragico, mentre fegato e milza apparivano moderatamente congesti e colliquati. Tutti gli esemplari presentavano enterite siero-catarrale (Tav. 7, Fig. e-f), in alcuni casi con iperemia gastrica e della parete intestinale. Nel 70% dei soggetti, per ciascun ceppo testato, si osservava intensa congestione encefalica. Gli esemplari infettati con ceppo X hanno presentato lesioni di gravità inferiore: lievi soffiusioni emorragiche esterne, splenomegalia e lieve enterite; l'encefalo appariva congesto in tutti i soggetti. L'esame batteriologico eseguito su tre esemplari per gruppo ha rilevato crescita in purezza del corrispondente ceppo di *V. harveyi* sia da rene cefalico che da encefalo. Dagli esemplari dei ceppi V e X soppressi a 21 giorni p.i. l'esame batteriologico condotto su rene ed encefalo è risultato negativo.

**Tavola 7:** Lesioni anatomopatologiche conseguenti ad infezione da *V. harveyi*, in prove di patogenicità ed efficacia vaccinale. **Fig a:** Esemplare preagonico con evidente inscurimento della livrea, melanosi (freccia); esemplari con livrea normale (testa di freccia). **Fig. b:** Soffusioni emorragiche alla base delle pinne dorsali ed anale (frecce); inoculo IP e mortalità iperacuta (pre-challenge). **Fig. c:** Morte con dilatazione degli opercoli, protrusione e dilatazione della cavità buccale (*facies* asfittica); apici dei filamenti branchiali biancastri e necrotici (freccia). **Fig. d:** *Facies* asfittica in un numero elevato di esemplari. **Fig. e:** Dilatazione dell'intestino prossimale (freccia) con accumulo sieroso nel lume (enterite siero-catarrale), moderata congestione della sierosa. **Fig. f:** Dettaglio del tratto digerente ed organi associati. **Fig. g:** Congestione meningea marcata in un elevato numero di esemplari. **Fig. h:** Dettaglio dell'encefalo, congestione evidente in lobi ottici mesencefalici (freccia) e cervelletto (testa di freccia). **Fig. i:** Erosioni epiteliali multifocali con perdita delle scaglie (frecce); infezione per immersione. **Fig. l:** Ulcere dermiche con esposizione della muscolatura nella regione ventrale e nel peduncolo caudale (frecce); cheratite monolaterale (testa di freccia). Infezione per immersione in esemplare vaccinato. **Fig. m:** Ulcere dermiche ed erosione della pinna caudale (frecce) in esemplari vaccinati ed infettati per immersione.



### 3.2.2 Infezione mediante immersione

Degli 8 ceppi in grado di dare mortalità iperacuta via IP soltanto il ceppo VIII è stato in grado di causare sintomatologia e mortalità per immersione in giovanili di branzino, seppur con un'evoluzione molto più tardiva (mortalità del 10% a 72 ore; 50% a 12 giorni p.i.). Gli esemplari infettati con questo ceppo presentavano apatia e melanosi 24 ore prima della morte, evidenziando moderata enterite e congestione encefalica. L'esame batteriologico condotto su encefalo e rene cefalico ha rilevato in tutti gli esemplari morti presenza del ceppo VIII in purezza mentre l'esame batteriologico eseguito al termine della sperimentazione (21 giorni p.i.) su 3 branzini per gruppo ha dato esito negativo. L'esame batteriologico eseguito sulla sospensione batterica al termine dell'immersione infettante ha permesso il re-isolamento dei ceppi in purezza.

### 3.2.3 Selezione dei ceppi virulenti ed identificazione della DL<sub>70</sub>

La prova di infezione per inoculo IP per la selezione dei 4 ceppi più virulenti (dose  $3,6 \times 10^5$  ufc/esemplare) ha identificato i ceppi I, II e VI come i più patogeni. I ceppi III, IV e IX non hanno determinato mortalità significativa (0%; 0%; 10%) alla dose testata. Il ceppo VIII è stato incluso tra i patogeni in quanto l'unico in grado di determinare mortalità per immersione. L'analisi batteriologica dell'acqua prelevata post 96 ore dall'infezione IP non ha permesso per nessun gruppo sperimentale l'isolamento di colonie di *V. harveyi*. I risultati complessivi delle prove di infezione a diverse concentrazioni per la determinazione della DL<sub>70</sub> nei ceppi I, II, VI e VIII sono riportati in Tabella 20. È possibile evidenziare come, anche nelle infezioni con inoculo a concentrazione inferiore, la mortalità si evidenzia nelle prime 48 ore.

CEPPO V. HARVEYI	CONCENTRAZIONE BATTERICA IP	MORTALITÀ 16H	MORTALITÀ 48H	MORTALITÀ A 7 GIORNI	N° ESEMPLARI
I	$3,0 \times 10^8$ ufc/esemplare	100%	100%	100%	8
	$3,0 \times 10^7$ ufc/esemplare	100%	100%	100%	12
	$3,0 \times 10^6$ ufc/esemplare	83%	83%	83%	12
	$3,6 \times 10^5$ ufc/esemplare	-	20%	20%	10
	$3,0 \times 10^4$ ufc/esemplare	-	8%	8%	12
II	$3,0 \times 10^8$ ufc/esemplare	100%	100%	100%	8
	$3,0 \times 10^7$ ufc/esemplare	100%	100%	100%	12
	$3,0 \times 10^6$ ufc/esemplare	91%	91%	91%	12
	$3,6 \times 10^5$ ufc/esemplare	-	70%	70%	10
	$3,0 \times 10^4$ ufc/esemplare	-	17%	33%	12
VI	$3,0 \times 10^8$ ufc/esemplare	100%	100%	100%	8
	$3,0 \times 10^6$ ufc/esemplare	83%	100%	100%	12
	$3,6 \times 10^5$ ufc/esemplare	40%	80%	80%	10
	$3,0 \times 10^4$ ufc/esemplare	-	33%	42%	12
	$3,0 \times 10^3$ ufc/esemplare	-	8%	17%	12
VIII	$3,0 \times 10^8$ ufc/esemplare	100%	100%	100%	8
	$3,0 \times 10^6$ ufc/esemplare	100%	100%	100%	12
	$3,0 \times 10^5$ ufc/esemplare	91%	100%	100%	12
	$3,0 \times 10^4$ ufc/esemplare	-	33%	42%	12
	$3,0 \times 10^3$ ufc/esemplare	-	8%	8%	12

**Tabella 20:** Mortalità causata da diversi ceppi di *V. harveyi* con inoculo IP a differenti concentrazioni.

L'analisi statistica condotta secondo il modello Probit, con software SAS 9.4 ha calcolato il valore  $DL_{70}$  per i quattro ceppi in analisi come riportato in Tabella 21

CEPPO V. HARVEYI	DL70	IC95% INFERIORE	IC95% SUPERIORE
I	$1,7 \times 10^6$ ufc/eseemplare	$7,2 \times 10^5$ ufc/eseemplare	$6,5 \times 10^6$ ufc/eseemplare
	$2,6 \times 10^5$ ufc/g	$1,2 \times 10^5$ ufc/g	$7,3 \times 10^5$ ufc/g
II	$3,2 \times 10^5$ ufc/eseemplare	$9,2 \times 10^4$ ufc/eseemplare	$1,5 \times 10^6$ ufc/eseemplare
	$5,2 \times 10^4$ ufc/g	$1,6 \times 10^4$ ufc/g	$1,9 \times 10^5$ ufc/g
VI	$1,2 \times 10^5$ ufc/eseemplare	$4,4 \times 10^4$ ufc/eseemplare	$6,6 \times 10^5$ ufc/eseemplare
	$2,1 \times 10^4$ ufc/g	$7,6 \times 10^3$ ufc/g	$9,2 \times 10^4$ ufc/g
VIII	$5,6 \times 10^4$ ufc/eseemplare	$2,7 \times 10^4$ ufc/eseemplare	$2,1 \times 10^5$ ufc/eseemplare
	$9,3 \times 10^3$ ufc/g	$4,5 \times 10^3$ ufc/g	$3,5 \times 10^4$ ufc/g

**Tabella 21:** Determinazione della  $DL_{70}$  espressa come ufc/eseemplare ed in ufc/g di p.v. dell'eseemplare per ciascun ceppo di *V. harveyi*. Sono indicati gli intervalli di confidenza al 95% (IC95%).

Le prove di infezione condotte per immersione per i ceppi I, II, VI e VIII alle concentrazioni  $1 \times 10^8$  ufc/ml e  $1 \times 10^9$  ufc/ml hanno evidenziato mortalità  $> 60\%$  unicamente per il ceppo VIII alla concentrazione più elevata. I risultati complessivi delle prove per immersione sono riportati in Tabella 22.

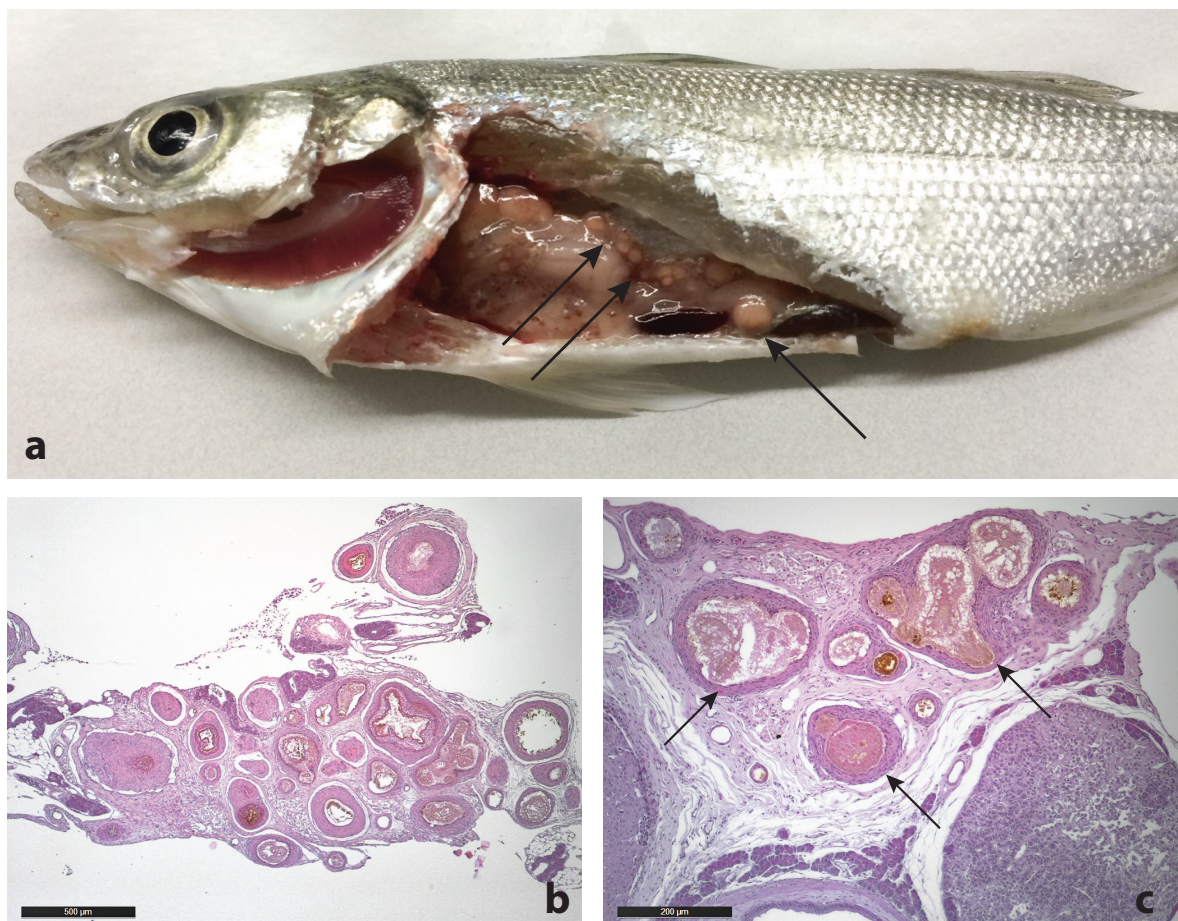
CEPPO V. HARVEYI	CONCENTRAZIONE BATTERICA IMMERSIONE	MORTALITÀ A 96 H	N° ESEMPLARI
I	$1 \times 10^9$ ufc/ml	8%	12
	$1 \times 10^8$ ufc/ml	0%	12
	$1,5 \times 10^7$ ufc/ml	0%	10
II	$1 \times 10^9$ ufc/ml	0%	12
	$1 \times 10^8$ ufc/ml	0%	12
	$1,5 \times 10^7$ ufc/ml	0%	10
VI	$1 \times 10^9$ ufc/ml	25%	12
	$1 \times 10^8$ ufc/ml	0%	12
	$1,5 \times 10^7$ ufc/ml	0%	10
VIII	$1 \times 10^9$ ufc/ml	67%	12
	$1 \times 10^8$ ufc/ml	25%	12
	$1,5 \times 10^7$ ufc/ml	50%	10

**Tabella 22:** Risultati delle prove di infezione per immersione a differenti concentrazioni.

### 3.3 Preparazione vaccinale

#### 3.3.1 Prove di sicurezza vaccinale (*safety test*)

L'inoculo delle preparazioni vaccinali IP (adjuvato e non adjuvato) a dose doppia (0,2 ml/esemplare) è stato ben tollerato dagli esemplari e non ha provocato mortalità né anoressia. Il periodo di osservazione per i branzini inoculati con vaccino adjuvato è stato di 12 settimane, al termine l'esame necroscopico ha evidenziato in tutti gli esemplari la presenza di residui di adjuvante in cavità celomatica (Tavola 8, Fig. a) associati ad incremento delle aderenze tra i visceri. Non sono state evidenziate melanizzazioni a livello muscolare o aderenze tra il pacchetto viscerale e la parete addominale. L'esame istologico ha evidenziato un infiltrato infiammatorio prevalentemente mononucleato (macrofagi, linfociti) diffuso nel tessuto adiposo viscerale e sulle superfici sierose del parenchima epatico e splenico in corrispondenza di goccioline contenenti adjuvante, con formazione di granulomi (Tavola 8, Fig b-c). L'esame istologico effettuato su alcuni esemplari inoculati con vaccino senza adjuvante non ha evidenziato alterazioni di sorta.

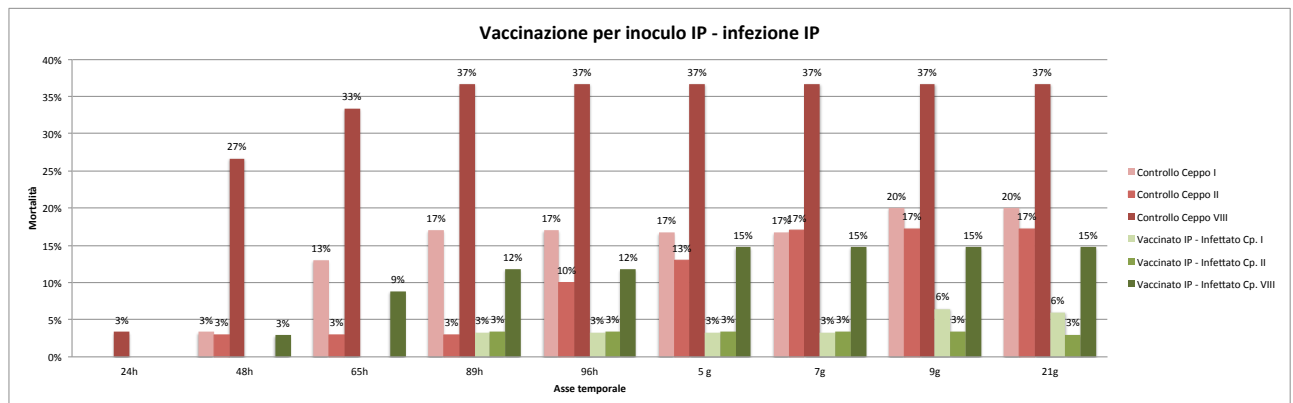


**Tavola 8:** *Safety test* condotto per il vaccino adjuvato somministrato IP a dose doppia (0,2 ml), valutazione post 12 settimane. **Fig. a:** Esame della cavità celomatica, presenza di goccioline di vaccino sulla superficie degli organi (freccie). **Fig. b - c:** esame istologico del tessuto adiposo viscerale con presenza di reazione infiammatoria cronica con formazione di granulomi attorno alle goccioline di adjuvante in progressivo assorbimento (freccie).

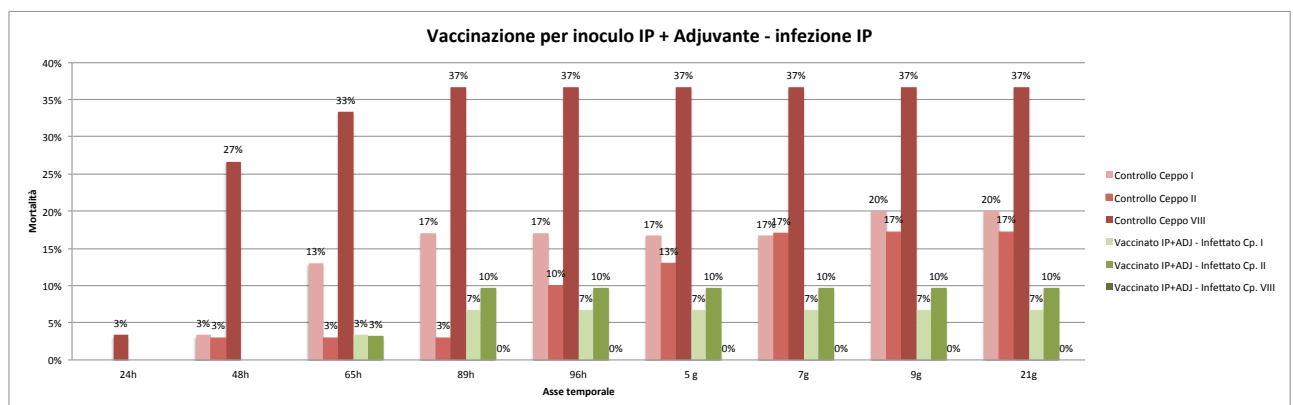
### 3.3.2 Prove di efficacia vaccinale (*potency test*)

#### 3.3.2.1 Prima prova

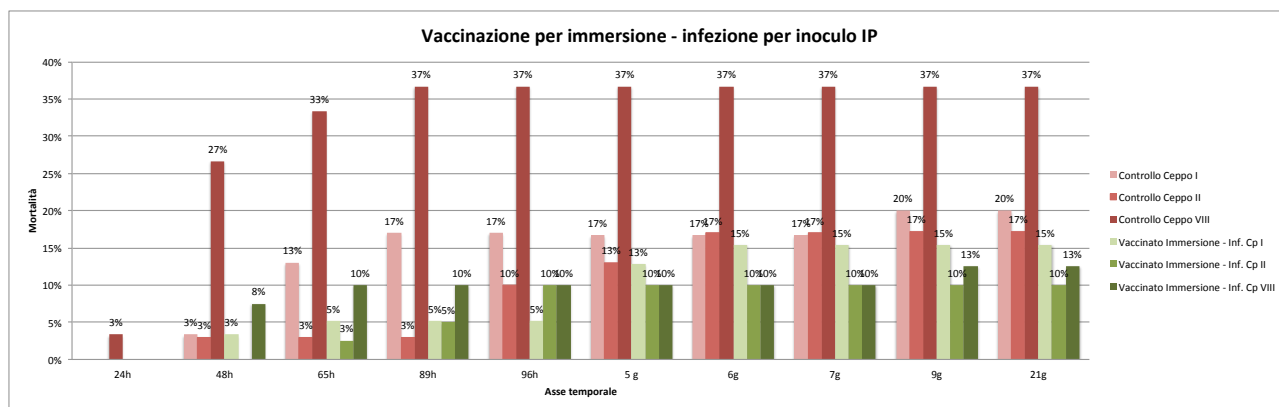
I risultati della prima prova di efficacia vaccinale, espressi come percentuale di mortalità, sono riportati nei Grafici 2, 3, 4, 5 per le differenti tipologie di vaccinazione: IP, IP adjuvato, immersione. Il protocollo vaccinale che ha evidenziato le percentuali di mortalità inferiori per i tre ceppi di *V. harveyi* testati è stato l'inoculo intraperitoneale di vaccino adjuvato (0-10%), seguito dall'inoculo IP non adjuvato (3-15%). Tuttavia la percentuale di mortalità nei gruppi di controllo inoculati IP con i ceppi I (20%), II (17%) e VIII (37%) è stata inferiore all'atteso (>60%). Gli esemplari vaccinati hanno generalmente presentato un ritardo di circa 24 -30 h nell'inizio della mortalità rispetto ai gruppi di controllo. I sintomi preagonici osservati nei gruppi di controllo (IP) sono stati riscontrati anche nei gruppi vaccinati, in particolare melanosmi e apatia precedevano di circa due ore la morte con segni di dispnea.



**Grafico 2:** Andamento della mortalità in esemplari vaccinati con inoculo non adjuvato ed infettati IP con 3 diversi ceppi di *V. harveyi* (1-21 giorni). I gruppi vaccinati sono evidenziati in verde, i gruppi controllo in rosso.

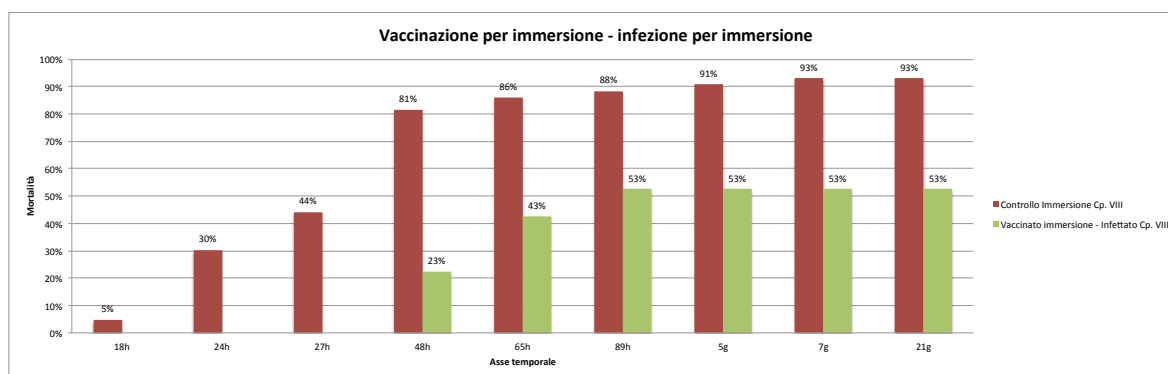


**Grafico 3:** Andamento della mortalità in esemplari vaccinati con inoculo adjuvato ed infettati IP con 3 differenti ceppi di *V. harveyi* (1-21 giorni). I gruppi vaccinati sono evidenziati in verde, i gruppi controllo in rosso.



**Grafico 4:** Andamento della mortalità in esemplari vaccinati per immersione ed infettati IP con 3 differenti ceppi di *V. harveyi* (1-21 giorni). I gruppi vaccinati sono evidenziati in verde, i gruppi controllo in rosso.

La prova di infezione per immersione con il ceppo VIII ha al contrario determinato una mortalità complessiva elevata (93%) nel gruppo di controllo con incipit a 18 h dall'esposizione, evidenziando lievi lesioni cutanee con perdita delle scaglie (Tav. 7, Fig. i). Gli esemplari vaccinati ed infettati per immersione hanno presentato una mortalità cumulativa del 53% sviluppatasi a partire da 48h dopo l'immersione. I branzini vaccinati hanno inoltre evidenziato lesioni cutanee più gravi rispetto al gruppo di controllo, come ulcere dermiche con esposizione della muscolatura, prevalentemente nel peduncolo caudale, nel 60% degli esemplari agonici e cheratiti monolaterali nel 10% (Tav. 7, Fig. l-m).



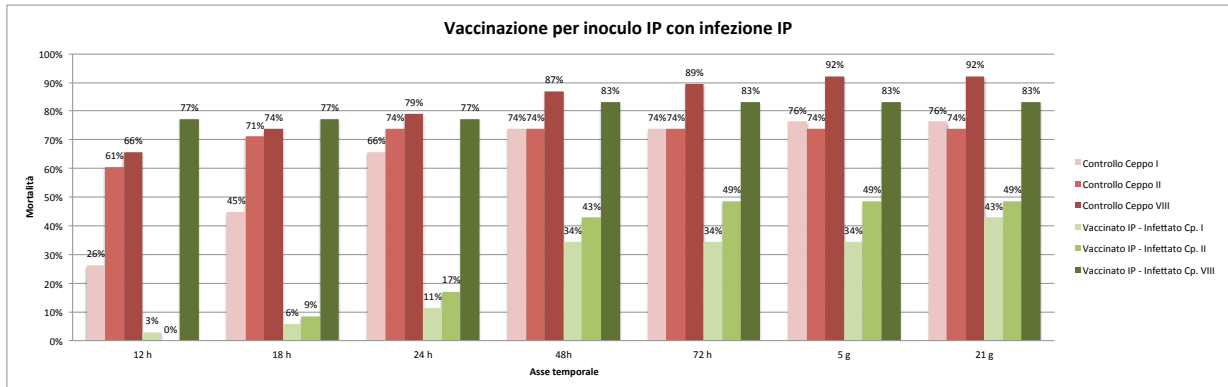
**Grafico 5:** Andamento della mortalità in esemplari vaccinati per immersione ed infettati per immersione con *V. harveyi* Cp. VIII (1-21 giorni). Il gruppo vaccinato è evidenziato in verde, il gruppo di controllo in rosso.

L'esame autoptico ha evidenziato costantemente in tutti gli esemplari dei gruppi sperimentali giunti a morte enterite sierocattarale e, da lieve ad intensa, congestione encefalica. Gli esami batteriologici condotti su tutti gli esemplari morti hanno permesso di isolare in purezza *V. harveyi* da encefalo e rene cefalico. L'esame autoptico condotto sugli esemplari soppressi al termine della sperimentazione non ha evidenziato lesioni significative e l'esame batteriologico eseguito da rene cefalico in tre esemplari per gruppo ha dato esito negativo.



### 3.3.2.2 Seconda prova

La seconda prova di efficacia vaccinale condotta con inoculo di vaccino non adjuvato ha ottenuto nei gruppi di controllo infettati IP una mortalità ottimale (>60%) per i tre ceppi di *V. harveyi* testati (Cp. I:76%; Cp. II: 74%; Cp.VIII: 92%). Gli esemplari vaccinati tuttavia hanno presentato una mortalità cumulativa elevata per i ceppi I, II e VIII (43%, 49%, 83%). L'andamento della mortalità è riportato nel Grafico 6.



**Grafico 6:** Andamento della mortalità in esemplari vaccinati con inoculo non adjuvato ed infettati IP con 3 differenti ceppi di *V. harveyi* (0-21 giorni). I gruppi vaccinati sono evidenziati in verde, i gruppi controllo in rosso.

### 3.3.3 Valutazione dell'efficacia vaccinale

La percentuale relativa di sopravvivenza è stata calcolata sulla base delle percentuali di mortalità di ciascun gruppo vaccinato comparato con la mortalità rilevata nel rispettivo gruppo di controllo. I risultati RPS della prima prova di vaccinazione sono riportati in Tabella 23, mentre i risultati della seconda prova di vaccinazione con vaccino non adiuvato sono riportati in Tabella 24.

GRUPPO VACCINALE	MORTALITÀ	p-value	RPS
Vaccinato Immersione - Infettato IP Cp I	15%	0,7513	23,1%
Vaccinato Immersione - Infettato. IP Cp II	10%	0,4747	42,0%
Vaccinato Immersione - Infettato IP Cp VIII	13%	0,0228	65,9%*
Vaccinato IP - Infettato IP Cp. I	6%	0,1466	70,0%
Vaccinato IP - Infettato IP Cp. II	3%	0,1028	82,6%
Vaccinato IP - Infettato IP Cp.VIII	15%	0,0808	59,9%
Vaccinato IP+ADJ - Infettato IP Cp. I	7%	0,0102	66,7%*
Vaccinato IP+ADJ - Infettato IP Cp. II	10%	0,4653	43,9%
Vaccinato IP+ADJ - Infettato IP Cp. VIII	0%	0,0003	100,0%*
Vaccinato immersione – Infettato immersione Cp.VIII	53%	<0,0001	43,6%*
Controllo Infettato per immersione Cp. VIII	93%		-
Controllo Infettato IP Cp. I	20%		-
Controllo Infettato IP Cp. II	17%		-
Controllo Infettato IP Cp. VIII	37%		-

**Tabella 23:** Risultati della prima prova di efficacia vaccinale. Per i diversi gruppi vaccinali vengono riportati i valori di mortalità, il valore di RPS calcolato ed il p-value calcolato tra le osservazioni dei gruppi vaccinali ed i rispettivi controlli. Con asterisco (\*) sono evidenziati i valori RPS che esitano da osservazioni con p-value < 0,05.

GRUPPO VACCINALE	MORTALITÀ	p-value	RPS
Vaccinato IP - Infettato IP Cp.I	43%	0,0044	43,8%*
Vaccinato IP - Infettato IP Cp.II	49%	0,0328	34,1%*
Vaccinato IP - Infettato IP Cp.VIII	83%	0,2963	9,9%
Controllo Infettato IP Cp. I	76%	-	-
Controllo Infettato IP Cp. II	74%	-	-
Controllo Infettato IP Cp.VIII	92%	-	-

**Tabella 24:** Risultati della seconda prova di efficacia vaccinale. Per i gruppi vaccinali testati con differenti ceppi vengono riportati i valori di mortalità, il valore di RPS calcolato ed il p-value calcolato tra le osservazioni dei gruppi vaccinali ed i rispettivi controlli. Con asterisco (\*) sono evidenziati i valori RPS che esitano da osservazioni con p-value < 0,05.

### 3.4 Analisi istologica ed immunoistochimica

L'esame istologico effettuato su esemplari agonici infettati mediante inoculo IP ha evidenziato un quadro di setticemia con presenza di colonie batteriche nel sistema circolatorio periferico, nelle camere cardiache e nel circolo meningeo (Tav. 9, Fig. d-e-h). Il tessuto adiposo viscerale ed il pancreas associato ai ciechi pilorici, più prossimi al sito di inoculo, hanno evidenziato intensa proliferazione batterica e fenomeni di necrosi della pancreas esocrino (Tav. 10, Fig. a-b). Nel parenchima epatico erano facilmente distinguibili aggregati batterici in assenza di evidente infiltrato infiammatorio (Tav. 10, Fig. d-e). In alcuni casi si è osservata perisplenite con numerose cellule macrofagiche fagocitanti i batteri (Tav. 10, Fig. g-i). Il rene presentava emorragie nel tessuto interstiziale (Tav. 11, Fig. a) e dilatazione del lume tubulare in presenza di cellule sfaldate e aumento di *rodlet cell* nell'epitelio tubulare (Tav. 11, Fig. e). Il tratto gastrointestinale evidenziava alterazioni significative a carico dell'intestino prossimale. La mucosa esofagea e gastrica non presentava in genere alterazioni, i ciechi pilorici hanno evidenziato moderato sfaldamento della mucosa e lievi emorragie della propria sottomucosa. Nell'intestino prossimale al contrario si osservava dilatazione del lume con distacco della mucosa dalla sottomucosa e successivo sfaldamento dell'epitelio (Tav 9, Fig. n-t), congestione ed emorragie nella sottomucosa in presenza di colonie batteriche anche sulla sierosa e nel lume intestinale (Tav. 9, Fig. p-q-s). L'intestino terminale non presentava queste alterazioni. Le branchie evidenziavano degenerazione e distacco dell'epitelio dalle *pillar cell* delle lamelle branchiali e congestione delle arteriole in presenza di aggregati batterici che, in alcuni casi, occludevano i vasi (Tav 9, Fig. a-b). L'encefalo presentava intensa congestione dei vasi meningei ed encefalici (Tav. 9, Fig. h-i) ed in alcuni esemplari è stato possibile osservare encefalite batterica con diffusione perivasale delle colonie batteriche (Tav 9, Fig. i-m). Esemplari infettati con i tre ceppi di *V. harveyi* in esame presentavano alterazioni istologiche sovrapponibili. Negli esemplari infettati per immersione si è assistito a setticemia e diffusione sistemica di *V. harveyi* con alterazioni enteriche ed encefaliche sovrapponibili alla via IP. Si sono osservate inoltre ulcerazioni multifocali con sfaldamento dell'epitelio cutaneo e perdita delle scaglie con diffusione batterica nel derma compatto e nel sottostante ipoderma e tessuto muscolare (Tav. 11, Fig. f-g-h-i) con estesi fenomeni necrotici (miosite batterica).

**Tavola 9:** Quadri istopatologici di branchia, cuore, encefalo ed intestino prossimale prelevati da esemplari infettati via IP con *V. harveyi* e comparati con tessuti normotipici di branzino. **Fig. a:** Tessuto branchiale con congestione delle arteriole branchiali, sfaldamento e parziale distacco dell'epitelio dalle *pillar cell* (freccie); colorazione E/E. **Fig. b:** Filamenti branchiali con ipertrofia e degenerazione epiteliale, colonie batteriche evidenziate da immunoprecipitati di colore rosso principalmente nelle arteriole branchiali (freccie); colorazione IHC. **Fig. c:** Tessuto branchiale normotipico; E/E. **Fig. d:** Miocardio ventricolare con evidenti colonie batteriche (freccie); E/E. **Fig. e:** Miocardio ventricolare con *V. harveyi* evidenziati in rosso (freccie); IHC. **Fig. f:** Bulbo arterioso con colonie batteriche; IHC. **Fig. g:** Dettaglio delle cellule di *V. harveyi* con morfologia bacillare in bulbo arterioso; IHC. **Fig. h:** Lobo ottico del mesencefalo con congestione dei vasi meningei (freccie) ed encefalici, malacia del parenchima cerebrale (resta di freccia); E/E. **Fig. i:** Lobo ottico mesencefalico con marcata congestione dei vasi encefalici (freccie), E/E. **Fig. l:** Presenza di cellule batteriche nel parenchima mesencefalico; IHC. **Fig. m:** Dettaglio di *V. harveyi* nella sostanza grigia cerebrale; IHC. **Fig. n:** Intestino prossimale con scollamento dell'epitelio dalla propria sottomucosa (freccie); E/E. **Fig. o:** Intestino prossimale normotipico; E/E. **Fig. p:** Intestino prossimale con proliferazione batterica in sierosa e tonaca muscolare (\*), scollamento dell'epitelio (freccia); E/E. **Fig. q:** Proliferazione batterica sulla sierosa (\*) e tonaca muscolare; IHC. **Fig. r:** Presenza di batteri nel connettivo della lamina propria

dell'intestino prossimale (frecche); IHC. **Fig. s:** Aggregati batterici nel lume intestinale (\*); IHC. **Fig. t:** Dilatazione del lume del tratto medio dell'intestino associata a sfaldamento dell'epitelio; IHC. **Fig. u:** Intestino medio normotipico; E/E.

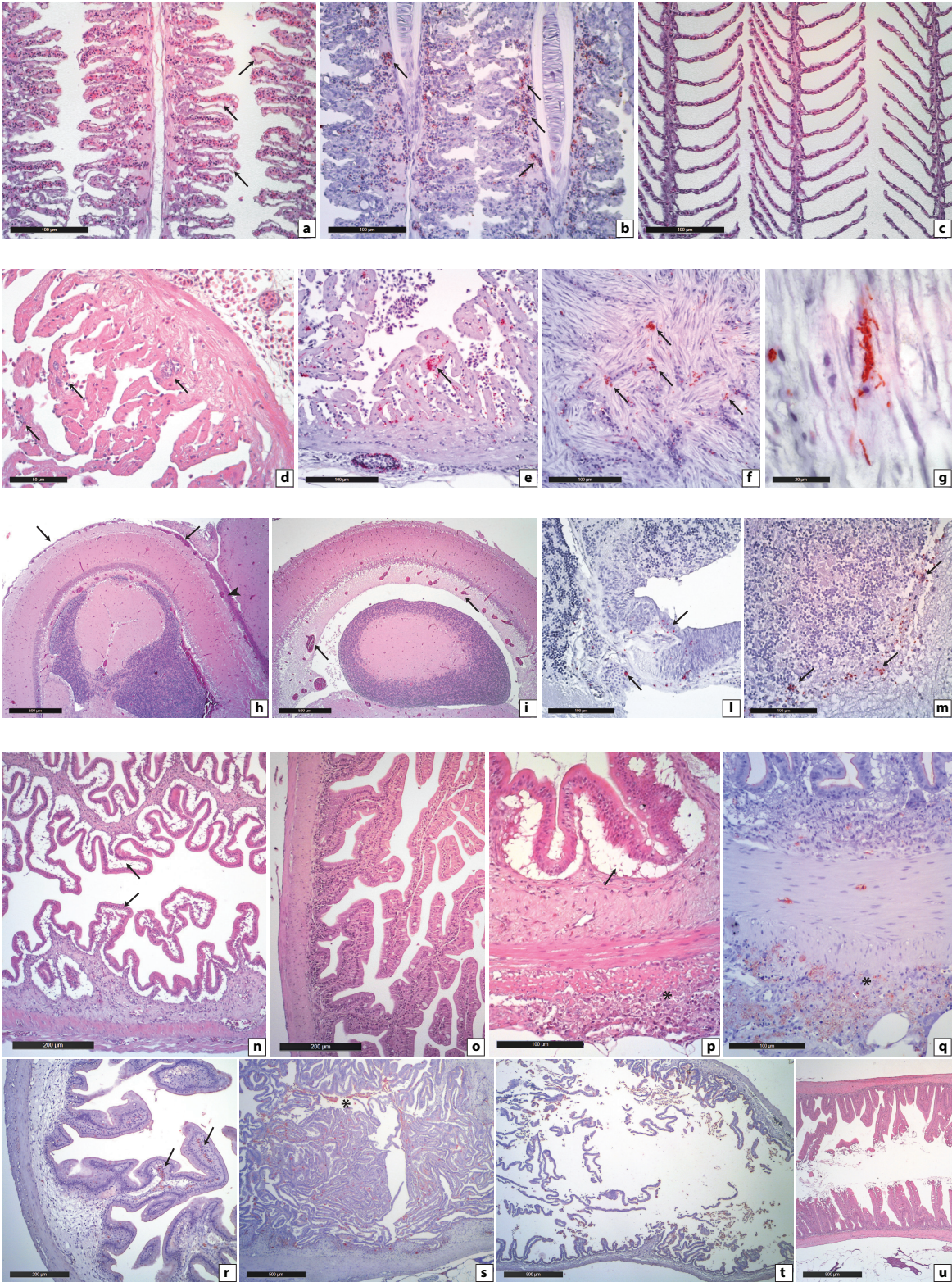
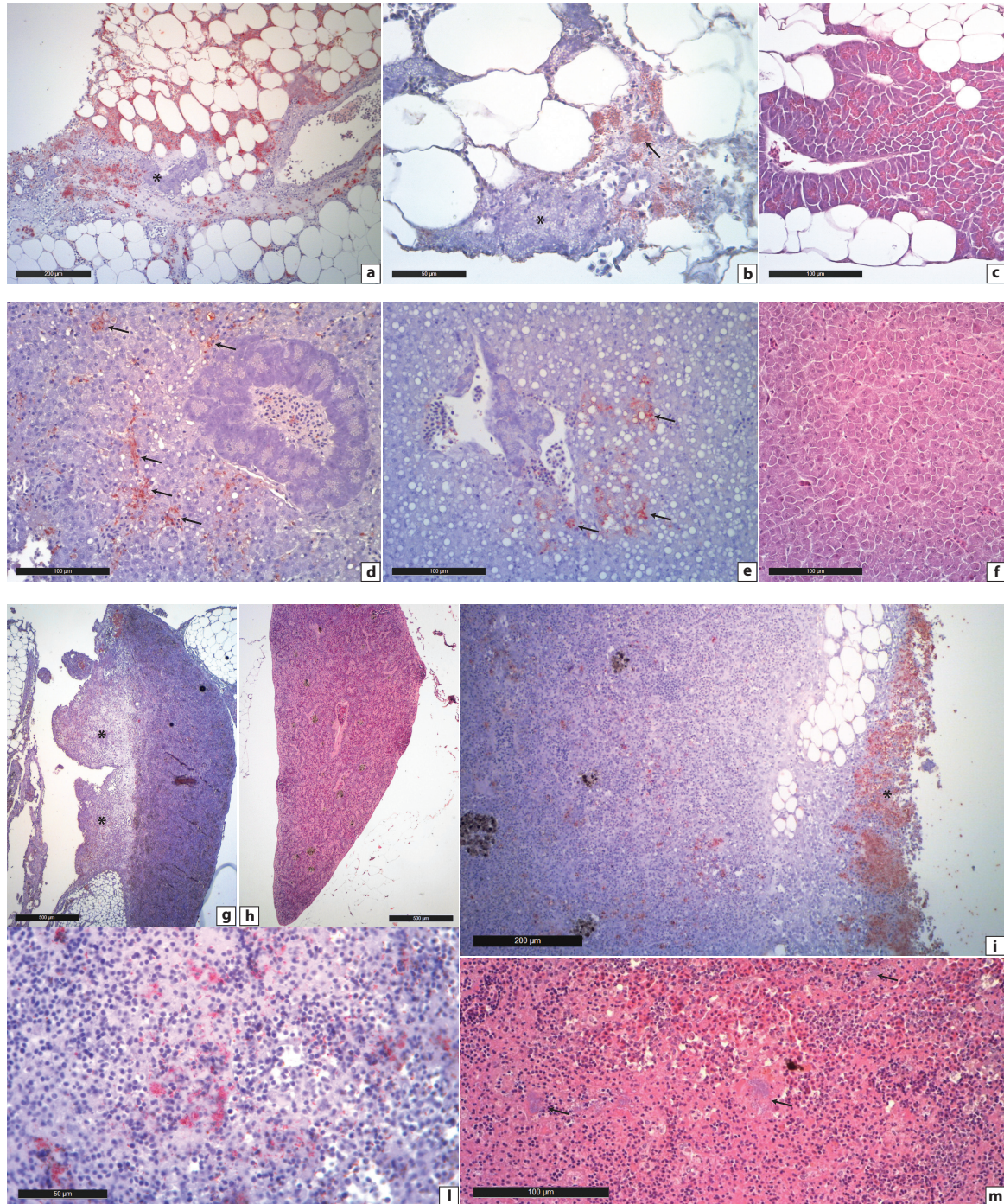
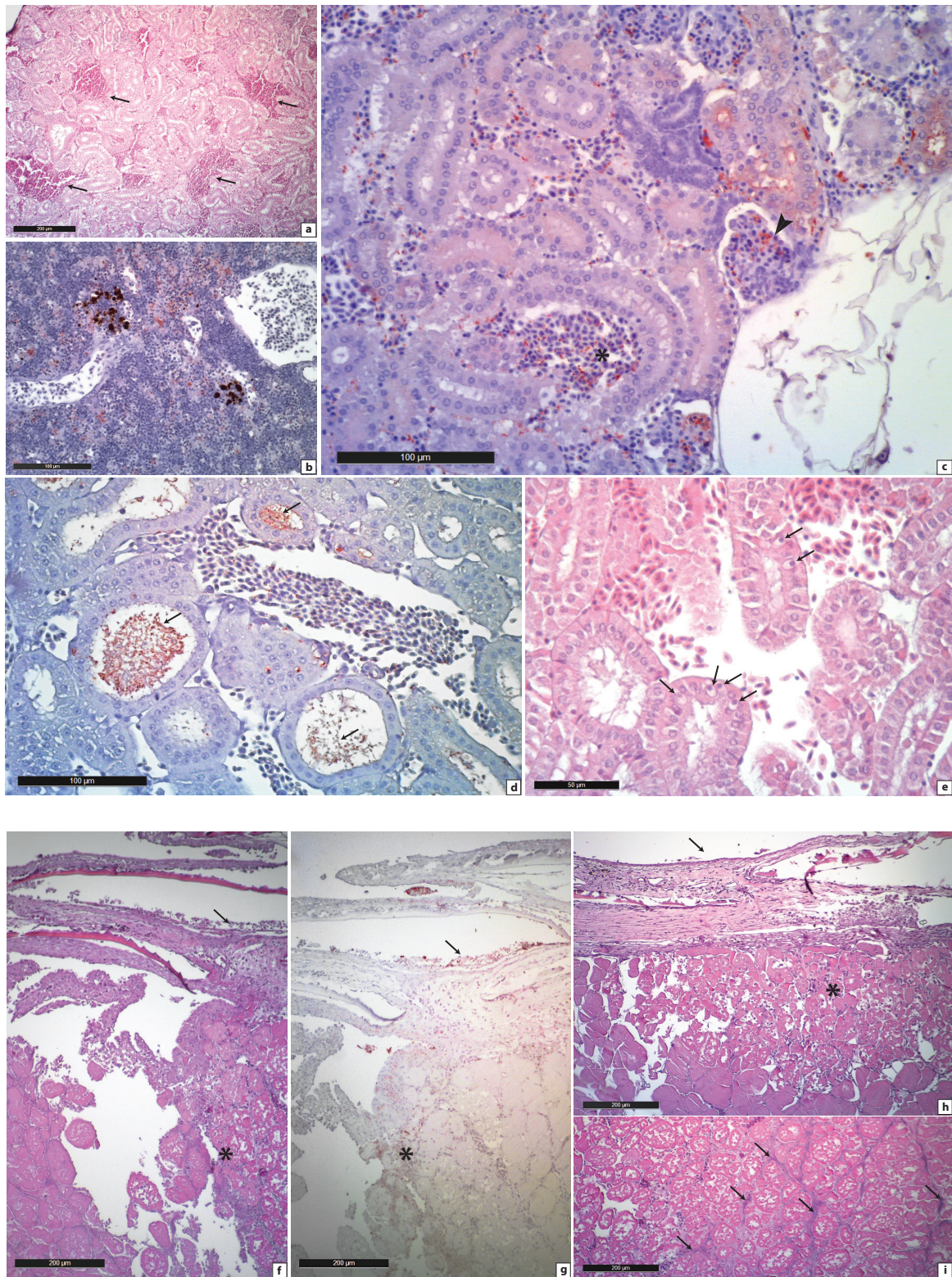


Tavola 9.

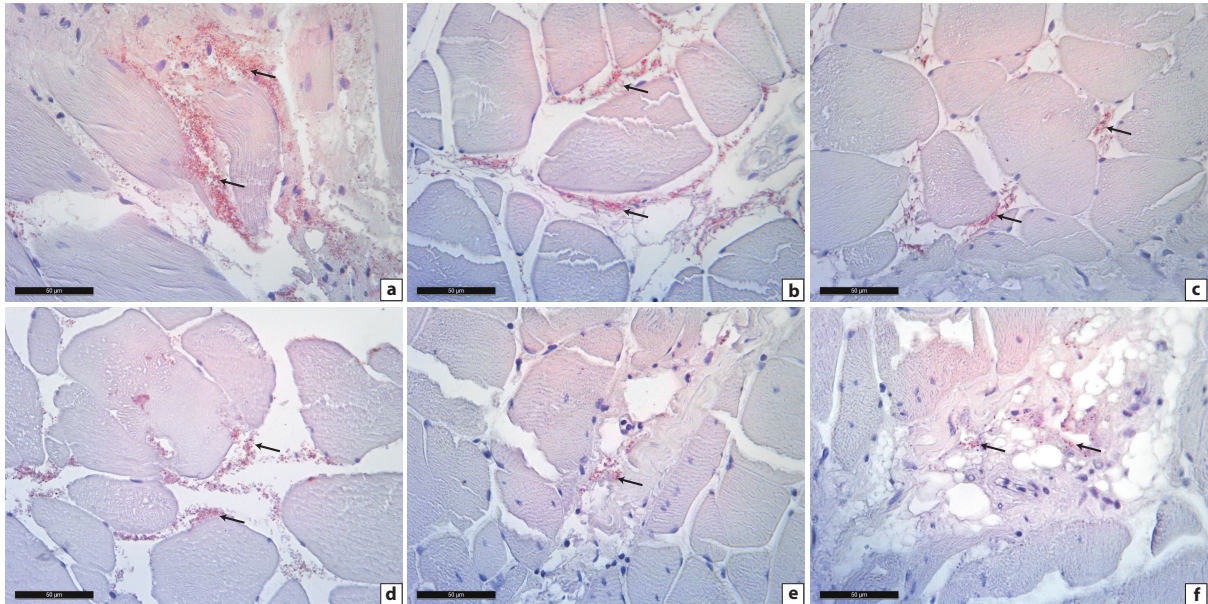


**Tavola 10:** Quadri istopatologici di pancreas, fegato e milza prelevati da esemplari infettati via IP con *V. harveyi* e comparati con tessuti normotipici di branzino. **Fig. a:** Estesa infiltrazione di cellule batteriche tra gli adipociti del tessuto adiposo viscerale e fenomeni necrotici a carico del pancreas esocrino (\*) associato ai ciechi pilorici; colorazione IHC. **Fig. b:** Dettaglio del pancreas esocrino in degenerazione (\*) e delle colonie batteriche (freccia); colorazione IHC. **Fig. c:** Tessuto pancreatico normotipico; E/E. **Fig. d:** Tessuto epatico con evidenti colonie batteriche (freccie); IHC. **Fig. e:** Dettaglio del parenchima epatico con *V. harveyi* evidenziati in rosso (freccia); IHC. **Fig. f:** Tessuto epatico normotipico; E/E. **Fig. g:** Perisplenite (\*) con infiltrazione infiammatoria mononucleata; IHC. **Fig. h:** Milza normotipica; E/E. **Fig. i:** Dettaglio dell'infiltrazione mononucleata nel perisplenio, macrofagi fagocitanti *V. harveyi* (\*); IHC. **Fig. j:** Presenza di cellule batteriche nel parenchima splenico; IHC. **Fig. k:** Colonie batteriche nel parenchima splenico; E/E.



**Tavola 11:** Quadri istopatologici di rene cefalico, rene del tronco, cute e tessuto muscolare prelevati da esemplari infettati via IP o per immersione con *V. harveyi*. **Fig. a:** emorragie nel tessuto interstiziale del rene del tronco (freccie); E/E. **Fig. b:** Colonie di *V. harveyi* diffuse nel rene cefalico; IHC. **Fig. c:** Cellule batteriche evidenziate nel tessuto interstiziale (\*) e nel glomerulo renale (testa di freccia); IHC. **Fig. d:** Aggregati batterici nel lume dei tubuli distali del rene del tronco; IHC. **Fig. e:** Presenza di rodlet cell nell'epitelio tubulare renale (freccie) ed emorragie interstiziali; E/E. **Fig. f:** Erosione dell'epitelio cutaneo, proliferazione batterica nella tasca della scaglia (freccia) e diffusione in profondità nel derma lasso e nel tessuto connettivo muscolare (endomisio, perimio) con estesi fenomeni necrotici delle fibre muscolari (\*). Infezione per immersione; E/E. **Fig. g:** Colorazione IHC della medesima sezione (Fig. f). **Fig. h:** Dettaglio dell'erosione epiteliale (freccia) e della necrosi muscolare associata a proliferazione batterica (\*); E/E. **Fig. i:** Proliferazione batterica lungo il perimio della muscolatura assiale del dorso (freccie).

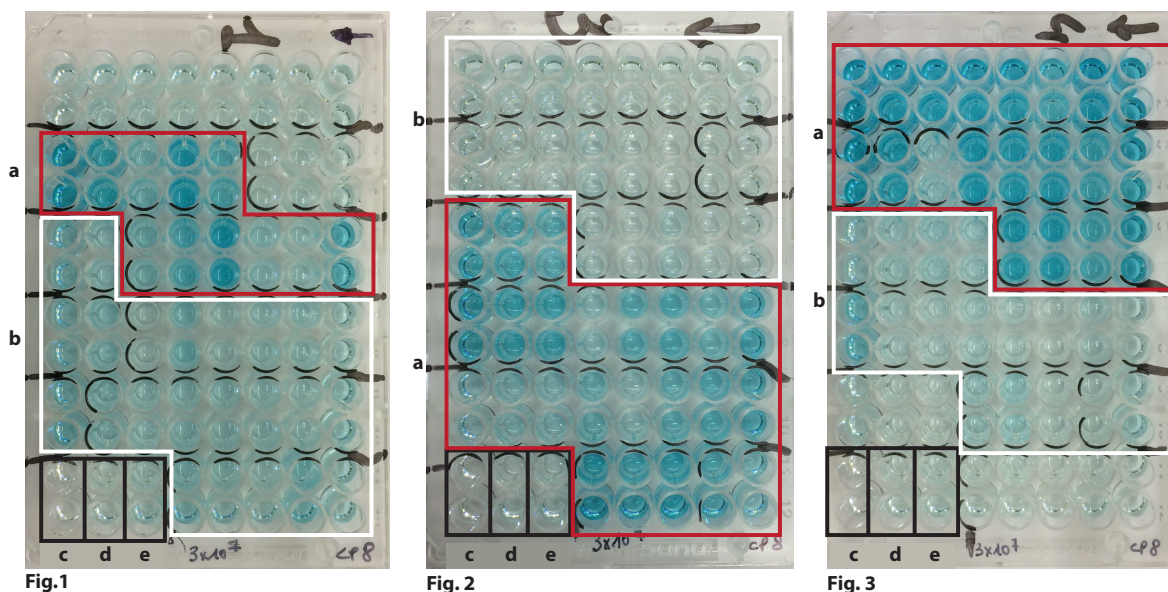
L'esame immunocistochemico ha permesso di evidenziare con maggior facilità rispetto alla colorazione E/E ed alla colorazione di Gram-Twort le colonie batteriche nei tessuti. Le prove di specificità del siero policlonale prodotto in coniglio eseguite con tessuti infiltrati con colonie batteriche di diverse specie batteriche della famiglia Vibrionaceae hanno evidenziato tuttavia una cross-reattività del siero nei confronti delle 8 specie testate (Tavola 12).



**Tavola 12:** Specificità del siero policlonale applicato in IHC. Presenza di immunoprecipitati in corrispondenza delle cellule batteriche in tutti i ceppi valutati. **Fig. a:** *V. harveyi*; **Fig. b:** *V. campbellii*; **Fig. c:** *V. alginolyticus*; **Fig. d:** *V. neptunius*; **Fig. e:** *V. vulnificus*; **Fig. f:** *P. damsela* subsp. *damsela*. Le frecce indicano le colonie batteriche marcate.

### 3.5 Sierologia

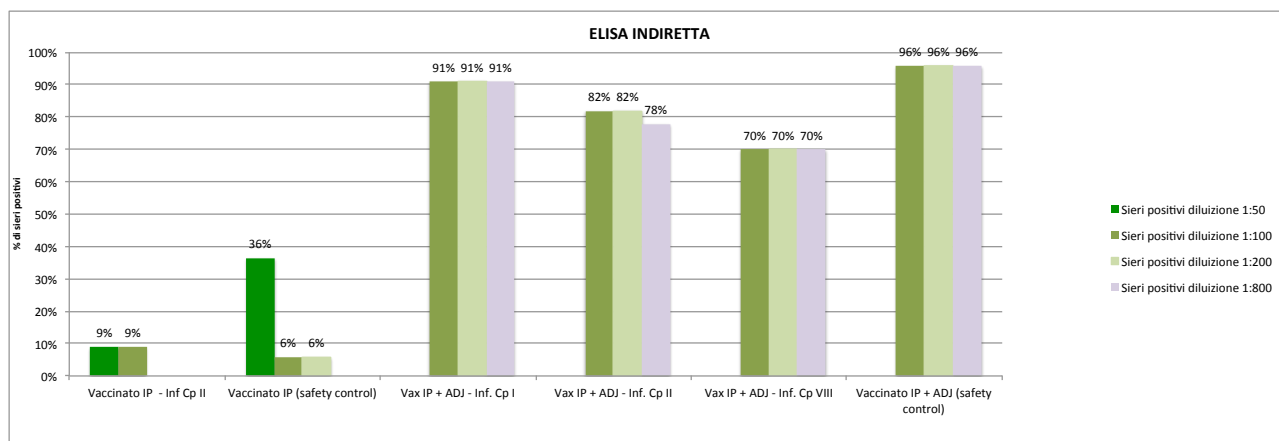
L'analisi dei sieri è stata condotta mediante ELISA indiretta con adsorbimento di un solo ceppo batterico (Cp. VIII) alla concentrazione di  $3 \times 10^6$  ufc per pozzetto. Alla diluizione 1:100 in PBS dei sieri prelevati dai branzini impiegati nel safety test vaccinale e nella prima prova di vaccinazione è stato possibile identificare sieri positivi (DO superiore al doppio della DO del controllo negativo) prevalentemente dagli esemplari vaccinati mediante inoculo IP con vaccino adiuvato appartenenti al safety test (96%; 22+/23 sieri testati) o sottoposti a challenge sperimentale (81%; 26+/32 sieri testati) (Tavola 13).



**Tavola 13:** Micropiastre per valutazione in ELISA indiretta del siero (diluito 1:100) di branzini immunizzati con vaccino IP adjuvato e non adjuvato (*safety test*) e branzini vaccinati e controlli, sottoposti a infezione sperimentale (*I potency test*). Le immagini si riferiscono alla reazione enzimatica con colorazione bluastra del cromogeno TMB, prima della reazione di stop con acido solforico. I pozzetti c – d – e contengono i controlli negativi: rispettivamente il controllo anti-IgG di coniglio, il controllo siero anti-Ig di branzino ed il siero negativo di branzino. **Fig. 1:** I pozzetti riquadrati in rosso (a) contengono sieri di branzini vaccinati IP con adjuvante e infettati con *V. harveyi* Cp II; i pozzetti riquadrati in bianco (b) contengono sieri di vaccinati IP senza adjuvante ed infettati con Cp VIII – I – II; i pozzetti non riquadrati contengono i branzini controllo infettati con Cp II. **Fig. 2:** I pozzetti riquadrati in rosso (a) contengono sieri di branzini vaccinati IP con adjuvante e infettati con *V. harveyi* Cp I - VIII; i pozzetti riquadrati in bianco (b) contengono sieri di controlli infettati con Cp I – VIII. **Fig 3:** I pozzetti riquadrati in rosso (a) contengono sieri di branzini vaccinati IP con adjuvante (*safety test*); i pozzetti riquadrati in bianco (b) contengono sieri di vaccinati IP senza adjuvante (*safety test*); i pozzetti non riquadrati contengono PBS (analoghi al controllo del pozzetto d).

Questi sieri hanno evidenziato una DO media pari a  $1000 \pm 100$ , mentre i sieri di controllo ottenuti da branzini inoculati con solo adjuvante hanno presentato DO  $460 \pm 80$ . I sieri negativi da branzini non inoculati (controllo negativo) hanno evidenziato una DO media di  $220 \pm 20$ . Gli esemplari vaccinati IP con vaccino non adjuvato hanno evidenziato ridotte percentuali di positività: 6% nei sieri ottenuti dal *safety test* (1+/17), 4% considerando complessivamente i sieri del *potency test* (1+/28 sieri). I soggetti vaccinati per immersione non hanno evidenziato positività (0+/39) ed anche gli esemplari dei 3 gruppi controllo non hanno sviluppato anticorpi IgM identificabili mediante ELISA (0+/33). I sieri positivi ottenuti dalla vaccinazione con inoculo adjuvato sono stati valutati a diluizioni successive mantenendo una positività evidente anche a diluizione 1:800; mentre i sieri risultati dubbi alla diluizione 1:100 sono stati valutati alle diluizioni inferiori 1:50 ed i risultati sono riportati in dettaglio nel Grafico 7.





**Grafico 7:** Risultati dell'analisi ELISA indiretta dei sieri prelevati durante il *safety test* ed il primo *potency test* vaccinale. Viene riportata la percentuale di sieri positivi alle diluizioni 1:50; 1:100; 1:200; 1:800.

### 3.6 Isolamento di *V. harveyi* da specie ornamentali

Alcuni episodi di mortalità osservati in specie ittiche ornamentali, stabulate presso acquari pubblici ed analizzati presso il laboratorio IZSVE (2012-2017), sono state ricondotte ad infezione da *V. harveyi*, isolato in purezza (patogeno primario) o associato ad infezioni miste da altre Vibrionaceae come *V. vulnificus*, *V. fluvialis*, *V. ordalii* e *P. damsela* subsp. *damsela*. Nei casi in cui è stato possibile eseguire una necropsia completa si sono rilevati i segni tipici associati alla vibriosi da *V. harveyi*: erosioni cutanee o delle pinne, dilatazione intestinale con contenuto sieroso, congestione meningeae e, meno frequentemente, oftalmite con ulcerazione corneale. In Tabella 25 sono riportate le specie suscettibili a *V. harveyi* osservate in questo studio.

SPECIE	SEGNI CLINICI	CEPPI BATTERICI ISOLATI	NOTE
<i>Heniochus acuminatus</i>	Erosione della pinna caudale, anemia branchiale, enterite sierosa, iperemia ed emorragie meningeae, splenomegalia, setticemia	<i>V. harveyi</i>	Infestazione <i>Cryptocaryon irritans</i>
<i>Pseudoanthias squamipinnis</i>	Erosioni cutanee, anemia branchiale, enterite sierosa-catarrale	<i>V. harveyi</i> , <i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i> , <i>V. ordalii</i>	
<i>Pterois volitans</i>	Vescicole cutanee con aloni iperemici, anemia ed ipermucosità branchiale, congestione perianale, enterite sierosa, splenomegalia	<i>V. harveyi</i> , <i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i>	Isolato da cute e rene
<i>Apolemichthys xanthurus</i>	Erosioni cutanee, ulcera corneale ed enterite sierosa	<i>V. harveyi</i> , <i>V. vulnificus</i> biotipo I	Ife fungine associate alle erosioni
<i>Caesio cuning</i>	Erosione cutanea nella regione del capo	<i>V. harveyi</i> , <i>V. vulnificus</i> biotipo I	Isolato da erosione cutanea
<i>Lutjanus kasmira</i>	Mortalità in presenza di erosioni cutanee	<i>V. harveyi</i> , <i>V. fluvialis</i>	Isolato da rene
<i>Chromis analis</i>	Mortalità in presenza di erosioni cutanee	<i>V. harveyi</i>	Isolato da rene

**Tabella 25:** Specie ornamentali suscettibili a vibriosi da *V. harveyi*. Sono riportate le lesioni anatomico-patologiche osservate e le specie batteriche compresenti.

## 4 DISCUSSIONE

### 4.1 Identificazione polifasica di *V. harveyi*

#### 4.1.1 Caratteristiche fenotipiche

L'analisi fenotipica dei ceppi di *V. harveyi* isolati da specie ittiche ha evidenziato un profilo biochimico relativamente omogeneo e comparabile con i dati riportati in letteratura (Appendice A).

Analisi in macrometodo e micrometodo e crescita su terreni differenziali e selettivi, hanno evidenziato come prove discriminanti per differenziare *V. harveyi* dai congeneri quelle riferite a: i) metabolismo amminoacidico: arginina deidrolasi (ADH-), lisina decarbossilasi (LDC+), ornitina decarbossilasi (ODC+); ii) metabolismo del citrato (CIT+), saccarosio (SAC+), indolo (IND +) e test di Voges-Proskauer (VP-); iii) colorazione gialla delle colonie in TCBS e bicolore rosa/lilla e bianco in CHROMagar™ Vibrio a 48 h. La luminescenza è stata osservata in una percentuale ridotta di isolati (14%). Risulta importante puntualizzare che alcuni test in micrometodo, come citrato e gelatinasi, richiedono fino a 72 ore per essere apprezzati; mentre il test per ureasi (API®20E™) appare poco sensibile se comparato con l'analisi in macrometodo (Christensen agar).

I ceppi isolati da molluschi bivalvi hanno evidenziato una maggior eterogeneità nei profili biochimici, con variabilità nel metabolismo del saccarosio, citrato, ornitina decarbossilasi e produzione di indolo. Nessuno di essi ha evidenziato luminescenza. Sebbene questi risultati siano analoghi a quelli riportati in letteratura nei gasteropodi (Nicolas et al., 2002), essi rendono l'identificazione di specie, esclusivamente mediante analisi biochimica, non ugualmente affidabile e necessitano la conferma di analisi molecolari. La variabilità fenotipica manifesta una variabilità del profilo proteico e conseguentemente una maggior variabilità nell'identificazione MALDI-TOF, effettivamente riscontrata per gli isolati da molluschi bivalvi, con possibile assegnazione a congeneri del clade *Harveyi* come *V. campbellii*.

Paragonando complessivamente i risultati ottenuti con i dati biochimici riportati in letteratura è possibile identificare tra i ceppi isolati da ospiti diversi (pesci, molluschi e crostacei) due differenze fenotipiche: metabolismo del saccarosio e luminescenza. I ceppi ittici presentano generalmente saccarolisi e luminescenza variabile (infrequente), i ceppi isolati in gamberi peneidi appaiono non saccarolitici e luminescenti, mentre i ceppi isolati in bivalvi e gasteropodi presentano saccarolisi variabile e luminescenza assente. L'interpretazione dei risultati ottenuti in micrometodo (API®20E™ bioMérieux) per i ceppi di *V. harveyi* mediante il software di identificazione Apiweb™ non ha dato risultati corretti, in quanto il database bioMérieux non contempla la specie *V. harveyi*. Le specie appartenenti al genere *Vibrio* con profili assegnati nel database sono *V. alginolyticus*, *V. cholerae*, *V. fluvialis*, *V. metschnikovii*, *V. mimicus*, *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus*. Conseguentemente l'assegnazione dei ceppi *V. harveyi* viene generalmente data a *V. alginolyticus*, la specie fenotipicamente più simile tra quelle presenti. Rivalutando gli isolati presenti nella ceppoteca IZSVe stoccati tra il 2006-2013 e classificati erroneamente come *V. alginolyticus*, è stato possibile

riassegnarli alla specie *V. harveyi*, evidenziando come in passato la lettura negativa del citrato a 24-48 ore, la mancanza di terreni differenziali come CHROMagar Vibrio™ e l'elaborazione tramite Apiweb™ possano aver determinato l'errore di identificazione.

#### 4.1.2 Approccio biomolecolare

L'identificazione della specie *V. harveyi* mediante amplificazione del gene *toxR* con primer specie-specifici è stata perfezionata rispetto al metodo pubblicato (Pang et al., 2006). In particolare è stata valutata la specificità della metodica applicandola ad un numero maggiore di specie della famiglia Vibrionaceae, non considerate precedentemente nello studio citato: *V. rotiferianus*, *V. owensii*, *V. mytili*, *V. gigantis*, *V. scophthalmi*, *V. ordalii*, *V. diabolicus*, *V. metschnikovii*, *V. xuii*, *P. damsela* subsp. *piscicida*.

Analizzando alcune specie del clade *Harveyi* si sono osservate amplificazioni aspecifiche applicando il protocollo termico pubblicato. È stato quindi necessario aumentare la temperatura di appaiamento dei primer a 61°C per incrementare la specificità della PCR e ridurre la presenza di bande multiple che potevano complicare la lettura del gel elettroforetico. Tuttavia per le specie *V. rotiferianus*, *V. owensii* e *V. gigantis* non è stato possibile eliminare del tutto gli amplificati aspecifici e si è osservata una banda di amplificazione (circa 600 bp) che appare però chiaramente differenziabile da quella ottenuta da *V. harveyi* (380 bp).

#### 4.1.3 Analisi filogenetica del gene *pyrH*

L'analisi filogenetica condotta comparando le sequenze del gene *pyrH* ottenute dagli isolati di *V. harveyi* oggetto di questo studio (60 ceppi) con sequenze *pyrH* di altre 23 specie di Vibrionaceae depositate in GenBank® ha evidenziato una buona capacità discriminante, raggruppando in maniera netta tutte le sequenze di *Vibrio harveyi* in un unico cluster. Il raffronto tra l'albero filogenetico ottenuto dall'analisi del singolo gene housekeeping *pyrH* con un albero ottenuto dall'analisi multilocus di 8 geni housekeeping (Sawabe et al., 2013), ha confermato i rapporti filogenetici tra le specie ascritte al clade *Harveyi*. In particolare nell'albero prodotto nel presente studio le specie *V. harveyi*, *V. rotiferianus*, *V. owensii*, *V. campbellii*, *V. jasicida* clusterizzano con *V. sagamiensis*, *V. azureus*, *V. natriegens*, *V. parahaemolyticus*, *V. mytili*, *V. diabolicus*, *V. alginolyticus* e *V. xuii*. Alcune di queste specie (*V. sagamiensis*, *V. jasicida*, *V. diabolicus*) non erano state incluse nell'analisi multilocus di Sawabe et al. (2013), ma la loro appartenenza al clade *Harveyi* è stata evidenziata in altri lavori (Yoshizawa et al., 2012; Yoshizawa et al., 2010; Goudenège et al., 2014). Complessivamente l'analisi del gene *pyrH* garantisce, da sola, una assegnazione di specie efficiente all'interno del clade *Harveyi* e la possibilità di eseguire analisi filogenetiche con risultati comparabili a quelli ottenuti con metodologie più complesse e costose, come l'analisi multilocus (MLSA).

## 4.2 Valutazione dell'antibiotico-resistenza e MIC

L'analisi comparativa tra i ceppi di *V. harveyi* di diversa provenienza ha evidenziato una differenza tra le MIC<sub>50</sub> e MIC<sub>90</sub> degli isolati clinici e di quelli ambientali, isolati da molluschi bivalvi, per enrofloxacin, gentamicina, sulfametossazolo + trimethoprim e flumequina. Differenze più marcate sono state osservate per le medesime molecole tra ceppi isolati da ornamentali ed ambientali. Questi risultati corrispondono a quanto atteso considerando che queste molecole sono quelle principalmente utilizzate nella terapia dei pesci ornamentali (enrofloxacin, sulfamidico potenziato e flumequina) ed applicate in acquacoltura marina per il trattamento delle vibriosi (sulfamidico potenziato e flumequina).

Comparando i risultati ottenuti tramite MIC con l'antibiogramma eseguito per diffusione in agar (Kirby-Bauer), è stato possibile osservare una buona concordanza con l'interpretazione degli aloni di inibizione ad eccezione dell'enrofloxacin, per la quale si sono osservati in numerosi ceppi diametri nel range intermedio/sensibile non proporzionali ai valori MIC (Tab. 17-18). Complessivamente tutti i ceppi identificati come resistenti mediante Kirby-Bauer hanno evidenziato, per la medesima molecola valori di MIC significativamente al di sopra della media. Considerando i ceppi isolati da casi clinici in branzino e orata soltanto un ceppo su 30 ha evidenziato in Kirby-Bauer resistenze multiple (florfenicolo, tetraciclina, ossitetraciclina e sulfamidico potenziato), mentre due ceppi hanno rilevato resistenza per singole molecole (ossitetraciclina o enrofloxacin). Nelle specie ornamentali si sono osservate resistenze multiple (enrofloxacin, flumequina) in 3 ceppi su 11 analizzati, riferibili all'isolamento in coltura successivo a trattamento farmacologico degli animali da parte degli acquaristi nel tentativo di curare la malattia in assenza di una corretta diagnosi eziologica.

La resistenza nei confronti dell'ampicillina è stata osservata nella totalità dei ceppi analizzati, sebbene si siano osservati in MIC valori significativamente ridotti per il ceppo *type strain* LMG 4044 ed un ceppo isolato da ornamentali. Elevati livelli di resistenza sono stati rilevati in MIC per antibiotici polipeptidici (colistina), mentre moderata sensibilità si è osservata per gli aminoglicosidi (aminosidina e apramicina) nella maggior parte dei ceppi indagati. Questi risultati appaiono in accordo con i dati riportati per ceppi isolati in ibridi di cernie in Cina (Zhu et al., 2018)

Se si paragonano i ceppi isolati da molluschi bivalvi, considerati in questo studio come ceppi ambientali, con il ceppo *type strain V. harveyi* LMG 4044 (isolato in anfipode) si può notare un aumento dei valori MIC in quasi tutte le molecole testate. Questi risultati appaiono simili a studi condotti su ceppi isolati in acqua marina in prossimità di allevamenti di bivalvi in Corea. Fenomeni di resistenza o riduzione della sensibilità sono stati infatti osservati mediante metodo Kirby-Bauer per numerose molecole: ampicillina, cefalosporine di I generazione ed aminoglicosidi (streptomycin, kanamicina, gentamicina, acido nalidixico) (Kang et al., 2014).

In generale i risultati dei due metodi evidenziano una limitata antibiotico-resistenza nei ceppi circolanti negli allevamenti italiani e mediterranei, probabilmente attribuibile sia alla diffusione relativamente recente dei focolai clinici di *V. harveyi* che alle ridotte percentuali di morbilità e mortalità ad essi associati, tali da non motivare l'allevatore ad intraprendere terapie antibiotiche generiche (in regime di emergenza) come può avvenire invece per *V. anguillarum*. L'andamento cronico della mortalità in *V. harveyi* consente in genere all'allevatore di attendere l'esito dell'antibiogramma fornito dal laboratorio, improntando conseguentemente una terapia mirata. In alcuni casi la terapia antibiotica non viene attuata in ragione del rapporto costo-beneficio o dell'applicabilità della terapia stessa (mortalità a stillo in periodo autunnale, decremento delle temperature e riduzione dell'ingestione di mangime medicato).

Si può quindi ipotizzare che il limitato numero di focolai clinici di *V. harveyi* in branzino soggetti a trattamento farmacologico mediante mangime medicato, riduca la possibilità di esposizione del batterio ad elevate concentrazioni di farmaco, impedendo conseguentemente la selezione di mutanti resistenti (assenza di pressione selettiva). Andranno comunque in futuro indagate le basi molecolari della resistenza per verificare se sono da ascrivere a fenomeni mutazionali o ricombinanti.

#### 4.3 Patogenicità in branzino

Le prove di patogenicità in branzino eseguite mediante inoculo IP hanno evidenziato tra i differenti ceppi una variabilità nella mortalità indotta a parità di dose infettante. Su 10 ceppi testati due hanno presentato scarsa o nulla mortalità, anche a dosi elevate ( $3 \times 10^8$  ufc/esemplare).

Il valore calcolato di  $DL_{70}$  per tre ceppi virulenti in branzini di 5-6 g (Cp. I:  $1,7 \times 10^6$  cfu/esemplare; Cp. II:  $3,2 \times 10^5$  ufc/esemplare; Cp. VIII:  $5,6 \times 10^4$  ufc/esemplare) è apparso proporzionalmente inferiore rispetto ai risultati ottenuti in un altro studio condotto in *D. labrax* (4,0-5,5 g) in cui la  $DL_{50}$  calcolata per 10 differenti ceppi variava tra  $1,5 \times 10^5 - 1,0 \times 10^7$  ufc/esemplare (Pujalte et al., 2003). Tuttavia i valori ottenuti nel presente studio appaiono compresi nel relativamente ampio range di valori riportati in letteratura per le infezioni sperimentali condotte con isolati di *V. harveyi* in altre specie ittiche. Alcuni studi hanno infatti evidenziato ceppi di *V. harveyi* moderatamente patogeni con  $DL_{50}$  elevate:  $2 \times 10^7$  cfu/g in *Epinephelus* sp. (Yii et al., 1997) e *Sciaenops ocellatus* (Liu et al., 2003);  $DL_{50}$  di  $4,90 \pm 0,2 \times 10^7$  ufc/esemplare in *Acanthopagrus cuvieri* e  $1,56 \pm 0,19 \times 10^9$  ufc/esemplare in *Epinephelus tauvina* (Saeed, 1995);  $DL_{50}$  variabile tra  $2,48 \times 10^5 - 8,76 \times 10^7$  ufc/g in *Paralichthys olivaceus* (Stowasser et al., 2008). Altri lavori hanno invece riscontrato ceppi ad elevata patogenicità con  $DL_{50}$  inferiori:  $1,4 \times 10^4$  ufc/g in *Lates calcarifer* (5-7 g) e  $8,3 \times 10^3$  ufc/g in *Cromileptis altivelis* (5-7g) (Ransangan et al., 2012);  $7,48 \times 10^4$  ufc/g in *Rachycentron canadum* (Liu et al., 2004);  $1,1 \times 10^5$  ufc/esemplare in *Epinephelus fuscoguttatus*  $\times$  *E. lanceolatus* (5 g) (Shen et al., 2017);  $3 \times 10^4$  ufc/g in *Trachinotus blochii* (25 g) (Pakingking et al., 2018). In specie d'acqua fredda, *Oncorhynchus mykiss* e *Salmo salar* (15-30 g), mortalità tra il 60 ed il 100% sono state ottenute da

differenti isolati di *V. harveyi*, evidenziando una  $DL_{50}$  variabile tra  $2,51-5,32 \times 10^5$  ufc/esemplare (Zhang & Austin, 2000). In *Paralichthys olivaceus* (10 g) mortalità del 87% sono state ottenute con inoculi IP di  $1,0 \times 10^7$  ufc/esemplare (Hu & Sun, 2011), mentre in *Epinephelus coioides* ( $40 \pm 5$  g) mortalità del 82,5% con inoculi IP di  $1,6-2,8 \times 10^7$  ufc/esemplare (Nguyen et al., 2017). In *Solea senegalensis* (5-10 g) sono stati sufficienti  $7 \times 10^6$  ufc/esemplare IP per determinare mortalità del 90%, mentre in *Sparus aurata* (10 g) inoculo IM di  $1 \times 10^4$  ufc/esemplare di differenti isolati ha causato mortalità variabili tra 30-100% (Haldar et al., 2010).

Nella prima prova di *potency* vaccinale la somministrazione IP ai gruppi di controllo di una dose infettante calcolata sulla base del peso degli esemplari ( $10 \pm 2$ g) e della stima statistica della  $DL_{70}$  (IC95% limite superiore) espressa in ufc/g non ha causato la percentuale attesa di mortalità (>60%) in nessuno dei 3 ceppi di *V. harveyi* valutati. Conseguentemente nella seconda prova di *potency* la concentrazione batterica dell'inoculo è stata lievemente aumentata raggiungendo valori di  $3,0 \times 10^7$  ufc/esemplare (Cp. I e II) e  $1,0 \times 10^7$  ufc/esemplare (Cp. VIII) in soggetti di taglia maggiore ( $35 \pm 5$ g), ottenendo mortalità ottimali nei controlli (74-92%). Queste concentrazioni appaiono maggiormente in linea con i risultati della letteratura precedentemente citati. L'andamento temporale della mortalità nei test di patogenicità mediante inoculo IP è stato piuttosto costante per tutti i ceppi valutati, evidenziando l'incipit tra le 12 e 16 ore post-inoculo e concludendosi nelle prime 96 ore. I ceppi somministrati alle dosi più elevate hanno determinato mortalità del 100% nell'arco delle prime 24 ore. Questi risultati sono in linea con quanto riportato in letteratura per le infezioni sperimentali condotte in *D. labrax* (mortalità entro le 24-48 ore) (Pujalte et al., 2003), in *L. calcarifer* e *C. altivelis* (Ransangan et al., 2012) ed *Epinephelus fuscoguttatus*  $\times$  *E. lanceolatus* (Shen et al., 2017) (mortalità entro le 72-96 ore); in *E. coioides* (Nguyen et al., 2017) e *Paralichthys sp.* (Zhu et al., 2006) mortalità entro le 96 ore.

Nel presente studio le prove di infezione condotte mediante immersione, applicando concentrazioni elevate di sospensione batterica ( $1 \times 10^8 - 1 \times 10^9$  ufc/ml applicate per 2 ore), hanno determinato mortalità significative (>60%) in un solo isolato di *V. harveyi* su 8 ceppi testati. L'evoluzione della mortalità rispetto alla somministrazione IP è stata per questo ceppo lievemente dilazionata, sviluppandosi tra le 48 e le 120 ore alla concentrazione inferiore ( $1 \times 10^8$  ufc/ml) mentre la concentrazione superiore ( $1 \times 10^9$  ufc/ml), applicata nelle prove di patogenicità e di *potency* vaccinale (controlli), ha evidenziato un andamento sovrapponibile alla via IP. La difficoltà nel riprodurre sperimentalmente l'infezione mediante semplice immersione in sospensione batterica è stata evidenziata in letteratura per ceppi altamente patogeni via IP in pompano, *Trachinotus blochii*, somministrando  $1 \times 10^8$  ufc/ml per un'ora (Pakingking et al., 2018), ed in cernie ibride, *Epinephelus fuscoguttatus*  $\times$  *E. lanceolatus* (Shen et al., 2017), somministrando  $2,76 \times 10^6$  ufc/ml, sia per immersione di 3 ore che per bagno prolungato di 14 giorni. In entrambe le specie non è stata osservata sintomatologia né mortalità. In altri studi invece è stato possibile indurre mortalità elevate (80%) mediante immersione a concentrazioni di  $1 \times 10^8$  ufc/ml in *E. coioides*, a partire dalle 72 ore post

immersione (Ningqiu et al., 2008). L'ipotesi che lesioni cutanee o oculari indotte da manipolazione o da ectoparassiti (*Lepeophtheirus* sp.) possano facilitare l'irruzione secondaria di *V. harveyi* è stata formulata in alcuni studi (Hispano et al., 1997; Kraxberger-Beatty et al., 1990; Pakingking et al., 2018) ed è stata dimostrata sperimentalmente in cernie ibride (Shen et al., 2017). Giovanili di cernia sono stati sottoposti ad abrasione dermica mediante asportazione di alcune scaglie (3 mm<sup>3</sup>) ed è stato possibile in questo caso indurre sintomatologia e mortalità con immersione in sospensione a concentrazione batterica molto bassa ( $2,76 \times 10$  ufc/ml, 67% mortalità) a partire dalle 72-96 ore post-infezione. In *D. labrax* non sono stati condotti studi simili, ma è plausibile che la presenza di lesioni cutanee possa facilitare significativamente l'impianto e la proliferazione sistemica di *V. harveyi*, causando mortalità anche a concentrazioni drasticamente inferiori a quelle applicate nel presente studio e più comparabili con le concentrazioni batteriche presenti nella realtà di allevamento.

#### 4.4 Lesioni anatomo-istopatologiche associate all'infezione da *V. harveyi*

I segni clinici osservati nei branzini sottoposti ad infezione IP con *V. harveyi* sono stati simili a quanto descritto in altre specie ittiche sottoposte ad infezioni sperimentali (*Epinephelus* spp.) (Nguyen et al., 2017; Yii et al., 1997). L'andamento iperacuto dell'infezione, caratterizzato da rapida setticemia, ha determinato segni evidenziabili circa 2 ore prima della morte degli esemplari, come letargia, iperventilazione e marcato inscurimento della livrea. In alcuni casi è stato possibile osservare grave alterazione del nuoto (nuoto a spirale). Soffusioni emorragiche alla base delle pinne e congestione della regione periorale ed opercolare sono state osservate unicamente negli esemplari sottoposti alla dose più elevata di inoculo ( $3 \times 10^8$  ufc/esemplare). Nel caso degli esemplari infettati mediante immersione è stato possibile rilevare, oltre a quanto descritto, anche sfrangiamento delle pinne, erosioni cutanee con progressiva perdita delle scaglie fino all'ulcerazione con esposizione della muscolatura, ed infezioni oculari (cheratiti). L'esposizione alla via di infezione naturale del patogeno ha determinato sperimentalmente in *D. labrax* le lesioni cutanee ed oftalmiche tipicamente osservate negli episodi descritti in letteratura in specie allevate e di cattura, riassunte nella Tabella 2. In particolare lesioni simili sono state descritte in ricciola (*S. dumerili*) (Minami et al., 2016), in ibridi di cernie (Shen et al., 2017) e in barramundi (*L. calcarifer*), nel quale *V. harveyi* è stato recentemente associato ad una patologia emergente caratterizzata dalla perdita delle scaglie e da necrosi muscolari (Dong et al., 2017).

L'esame autoptico condotto nel pre-challenge e nelle prove di patogenicità ha frequentemente rilevato una dilatazione del cavo orale e degli opercoli negli esemplari morti in forma iperacuta; questa evidenza è segnalata in altre infezioni sperimentali con *V. harveyi* condotte IP in *D. labrax* (Pujalte et al., 2003) ed è stata interpretata come segno di asfissia. L'analisi istologica di soggetti agonici ha permesso di evidenziare la rapida diffusione setticemica di *V. harveyi* e la compromissione degli scambi respiratori indotta sia dall'accumulo di colonie batteriche nelle arteriole lamellari, con progressivo rallentamento del circolo locale, che alla degenerazione dell'epitelio branchiale. Nella

seconda prova di *potency* vaccinale è stato possibile osservare marcata dilatazione degli opercoli nel 68% degli esemplari infettati con Cp. VIII (vaccinati e controllo), 20% degli infetti con Cp. I e nel 41% con Cp. II; proporzionale alla patogenicità dei ceppi testati. L'esame della cavità celomatica ha evidenziato nella maggior parte degli esemplari enterite con marcata dilatazione del tratto prossimale dell'intestino in presenza di liquido sieroso citrino e materiale biancastro mucoide derivato dallo sfaldamento dell'epitelio intestinale. Nonostante si sia evidenziata istologicamente la diffusione batterica anche nella mucosa gastrica e dell'intestino terminale, l'effetto citotossico appare localizzato nel tratto intestinale prossimale e medio. L'osservazione di enterite o gastroenterite sierosa con contenuto giallastro è riscontrata frequentemente in molte specie ittiche (Tabella 2) ed appare un segno distintivo dell'infezione da *V. harveyi*. Al contrario la congestione meningea e del parenchima encefalico, osservata costantemente negli esemplari giunti a morte nelle infezioni sperimentali in questo studio, appare raramente segnalata in letteratura, limitatamente ai Perciformi. Emorragie encefaliche sono evidenziate in barramundi (Dong et al., 2017) mentre nel branzino è riportata moderata congestione meningea e dei plessi corioidei (Florio et al., 2012) in esemplari con atassia natatoria. La congestione meningea associata ad alterazioni del nuoto in branzino, specialmente nei giovanili, può essere determinata da una infezione virale sostenuta da Betanodavirus (Pascoli et al., 2016). Risulta quindi necessario, negli episodi di mortalità in branzino in cui si osservino tali segni e lesioni, valutare in diagnosi differenziale i due agenti eziologici ed eseguire gli approfondimenti diagnostici del caso. Va inoltre considerando che è possibile la compresenza di Betanodavirus e *V. harveyi*, evenienza che è stata osservata in alcuni episodi di mortalità in allevamento indagati in questo studio.

#### 4.5 Efficacia della vaccinazione

Le prove di efficacia vaccinale hanno ottenuto complessivamente risultati inferiori a quanto atteso. Nonostante fosse stata calcolata sperimentalmente la  $DL_{70}$  mediante inoculo IP per ciascun ceppo impiegato di *V. harveyi*, nella prima prova vaccinale si è ottenuta una ridotta percentuale di mortalità nei gruppi di controllo (<40%); ciò ha causato difficoltà di interpretazione della prova. In particolare solo alcuni gruppi vaccinali in analisi (IP + adiuvante) hanno evidenziato differenze statisticamente significative con i rispettivi gruppi controllo (p-value < 0,05), mentre i ridotti valori di mortalità dei controlli (<60%) hanno reso scarsamente significativi i valori di RPS calcolati. Diversamente gli esemplari vaccinati mediante immersione ed infettati mediante immersione (Cp. VIII) hanno evidenziato una differenza nella percentuale di mortalità statisticamente significativa rispetto al gruppo controllo non vaccinato ed una RPS di 43,6%. Questo valore di RPS non appare comunque sufficiente per valutare pienamente efficace il protocollo vaccinale (optimum >60% per vaccini ad immersione). Va tuttavia considerato che in questo caso la prova di efficacia, valutata tramite la via di esposizione naturale al patogeno (immersione), ha previsto l'impiego di una



concentrazione elevatissima di cellule batteriche per indurre la mortalità desiderata nel gruppo di controllo. Tale condizione sperimentale appare poco rappresentativa della reale carica batterica presente nell'ambiente di allevamento. Data la pratica ormai consolidata, in alcune aziende spagnole e francesi, di vaccinare per immersione i giovanili di branzino con vaccini bacterin stabulogeni bivalenti, costituiti da due ceppi fenotipicamente differenti di *V. harveyi* (Le Breton, comunicazione personale), è possibile ipotizzare che la vaccinazione per immersione possa determinare nelle normali condizioni di allevamento (cariche batteriche medio-basse) una riduzione della mortalità sufficiente alle finalità degli allevatori.

I risultati ottenuti dalla seconda prova di vaccinazione, limitata alla valutazione del vaccino non adjuvato e somministrato IP, hanno evidenziato percentuali di mortalità elevate nei gruppi di controllo e differenze statisticamente significative tra gli esemplari vaccinati ed i rispettivi controlli per i ceppi I e II di *V. harveyi* valutati. Tuttavia i valori di RPS calcolati non sono stati soddisfacenti (Cp. I: 43,8%; Cp. II 34,1%), considerando come valore ottimale RPS >75% per vaccini IP. Nel caso dell'infezione con ceppo VIII, le differenze tra vaccinati e controlli non sono state statisticamente significative.

Interpretando i risultati delle prove vaccinali alla luce dei dati ottenuti dalle analisi sierologiche mediante ELISA è possibile associare la scarsa efficacia del vaccino non adjuvato alla assente o ridotta presenza di IgM sieriche contro *V. harveyi*. Soltanto il 6% degli esemplari vaccinati IP senza adjuvante e non sottoposti ad infezione (*safety test*) ed il 9% dei vaccinati e sottoposti a challenge (Cp. II) ha infatti sviluppato anticorpi rilevabili in ELISA. Allo stesso modo esemplari vaccinati mediante immersione non hanno evidenziato alcuna siero-conversione anche in seguito all'infezione con *V. harveyi*. Al contrario una elevata percentuale di esemplari inoculati con vaccino adjuvato ha evidenziato risposta rilevabile in ELISA, sia per quelli non sottoposti a challenge (*safety test* 96% positivi) che per quelli successivamente infettati con *V. harveyi* (Cp I 91%; Cp II 82%; Cp VIII 70%). Valutando le percentuali di mortalità nei gruppi vaccinati con bacterin ed adjuvante (primo *potency test*) è possibile rilevare come queste siano inferiori agli altri gruppi vaccinali; in particolare negli esemplari infettati con il ceppo più patogeno (Cp. VIII) la mortalità è stata assente rispetto al 43% di mortalità nei controlli. Tuttavia in mancanza di una sufficiente percentuale di mortalità nei gruppi controllo non è possibile definire realisticamente un RPS per tale gruppo vaccinale. Ulteriori prove di efficacia vaccinale sono pertanto richieste per verificare la maggior protezione indotta dall'impiego dell'adjuvante nella preparazione vaccinale.

## 5 CONCLUSIONI

Le analisi condotte hanno evidenziato un'ottima concordanza nell'identificazione di *V. harveyi* mediante differenti metodi diagnostici applicati su un elevato numero di ceppi di campo. L'analisi fenotipica ha evidenziato le prove biochimiche in macrometodo che risultano più discriminanti per *V. harveyi* rispetto ai congeneri, soprattutto per quanto riguarda i ceppi isolati da specie ittiche. L'amplificazione del gene *toxR* con primer specie-specifici appare promettente per rapidità e costo rispetto al sequenziamento del gene *pyrH*. L'identificazione mediante MALDI-TOF appare economica, rapida ed efficiente grazie all'implementazione preliminare del database Bruker Daltonics. Si mette quindi in evidenza come l'approccio polifasico possa garantire una più efficace identificazione della specie *V. harveyi*, minimizzando le imprecisioni di classificazione riscontrate in passato applicando unicamente i metodi fenotipici.

Oltre allo studio dei ceppi isolati da specie eduli allevate è stato possibile isolare *V. harveyi* in corso di episodi di mortalità caratterizzati da segni clinici peculiari in specie ornamentali appartenenti a sei differenti famiglie, ampliando così il numero di specie ittiche riconosciute suscettibili all'infezione.

Le prove di infezione con *V. harveyi* in branzino hanno evidenziato ceppi a differente virulenza ed hanno permesso di descrivere i segni clinici e le lesioni istologiche causate da questo microrganismo, riscontrando analogie con quanto già osservato in letteratura in altre specie ed evidenziando alcune tipicità per quanto concerne la patogenesi nell'ospite *D. labrax*.

Il vaccino polivalente sviluppato sembrerebbe presentare una RPS non ottimale, sia somministrato per immersione sia utilizzato per inoculo intraperitoneale (non adjuvato), pur determinando un dilazionamento della mortalità di 24-36 ore negli esemplari vaccinati rispetto ai controlli.

Va comunque evidenziato come la via di esposizione naturale al patogeno (immersione) abbia previsto l'impiego di una concentrazione elevatissima di cellule batteriche per indurre la mortalità desiderata nel gruppo di controllo, condizione che appare probabilmente poco rappresentativo delle reali concentrazioni del patogeno nell'ambiente di allevamento. L'applicazione del vaccino nella realtà produttiva come evidenziato dalla consolidata pratica francese e spagnola della vaccinazione per immersione, potrebbe portare a risultati migliori rispetto a quanto da noi evidenziato in condizioni sperimentali.

L'analisi sierologica condotta mediante ELISA ha rilevato una risposta anticorpale significativa unicamente negli esemplari inoculati con vaccino adjuvato. La ridotta risposta anticorpale negli esemplari vaccinati senza adjuvante potrebbe correlarsi alla scarsa risposta protettiva osservata ed ai valori di RPS conseguenti. Per completezza ulteriori prove di efficacia vaccinale dovranno essere condotte in branzino per valutare la protezione indotta *in vivo* dal vaccino IP adjuvato.

## 6 BIBLIOGRAFIA

- Agius, C., Horne, M.T., Ward, P.D., 1983. Immunization of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, against vibriosis: comparison of an extract antigen with whole cell bacterins by oral and intraperitoneal routes. *J. Fish Dis.* 6, 129–134.
- Alcaide, E., Gil-Sanz, C., Sanjuan, E., Esteve, D., Amaro, C., Silveira, L., 2001. *Vibrio harveyi* causes disease in seahorse, *Hippocampus* sp. *J. Fish Dis.* 24, 311–313. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.2001.00297.x>
- Alvarez, J.D., Austin, B., Alvarez, A.M., Reyes, H., 1998. *Vibrio harveyi*: a pathogen of penaeid shrimps and fish in Venezuela. *J. Fish Dis.* 21, 313–316.
- Amend, D.F., 1981. Potency testing of fish vaccines. *Dev. Biol. Stand.* 49, 447–454.
- Antipa, R., Amend, D.F., 1977. Immunization of Pacific salmon: Comparison of intraperitoneal injection and hyperosmotic infiltration of *Vibrio anguillarum* and *Aeromonas salmonicida* bacterins. *J. Fish. Res. Bd. Can* 34, 203–208.
- Arijo, S., Rico, R., Chabrillon, M., Diaz-Rosales, P., Martínez-Manzanares, E., Balebona, M.C., Magariños, B., Toranzo, A.E., Moriñigo, M.A., 2005. Effectiveness of a divalent vaccine for sole, *Solea senegalensis* (Kaup), against *Vibrio harveyi* and *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *J. Fish Dis.* 28, 33–38. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2004.00597.x>
- Austin, B., 2010. Vibrios as causal agents of zoonoses. *Vet. Microbiol.* 140, 310–317. <https://doi.org/10.1016/J.VETMIC.2009.03.015>
- Austin, B., Zhang, X.-H., 2006. *Vibrio harveyi*: a significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates. *Lett. Appl. Microbiol.* 43, 119–24. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.01989.x>
- Avrameas, S., Ternynck, T., 1995. Natural antibodies: The other side of the immune system. *Res. Immunol.* 146, 235–248.
- Balcázar, J.L., Planas, M., Pintado, J., 2012. *Vibrio inhibens* sp. nov., a novel bacterium with inhibitory activity against *Vibrio* species. *J. Antibiot. (Tokyo).* 65, 301–305. <https://doi.org/10.1038/ja.2012.22>
- Balebona, M.C., Zorrilla, I., Moriñigo, M.A., Borrego, J.J., 1998. Survey of bacterial pathologies affecting farmed gilt-head sea bream (*Sparus aurata* L.) in southwestern Spain from 1990 to 1996. *Aquaculture* 166, 19–35. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(98\)00282-8](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00282-8)
- Baumann, P., Baumann, L., Bang, S.S., Woolkalis, M.J., 1980. Reevaluation of the taxonomy of *Vibrio*, *Benecke* and *Photobacterium*: Abolition of the genus *Benecke*. *Curr. Microbiol.* 4, 127–132. <https://doi.org/10.1007/BF02602814>
- Becker, P., Gillan, D., Lanterbecq, D., Jangoux, M., Rasolofonirina, R., Rakotovao, J., Eeckhaut, I., 2004. The skin ulceration disease in cultivated juveniles of *Holothuria scabra* (Holothuroidea, Echinodermata). *Aquaculture* 242, 13–30. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2003.11.018>

- Becker, P.T., Gillan, D.C., Eeckhaut, I., 2009. Characterization of the bacterial community associated with body wall lesions of *Tripneustes gratilla* (Echinoidea) using culture-independent methods. *J. Invertebr. Pathol.* 100, 127–130. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jip.2008.11.002>
- Bertone, S., Gili, C., Moizo, A., Calegari, L., 1996. *Vibrio carchariae* associated with a chronic skin ulcer on a shark, *Carcharhinus plumbeus* (Nardo). *J. Fish Dis.* 19, 429–434.
- Botham, J.W., Manning, M.J., 1981. The histogenesis of the lymphoid organs in the carp *Cyprinus carpio* L. and the ontogenetic development of allograft reactivity. *J. Fish Biol.* 19, 403–414. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1981.tb05844.x>
- Buller, N.B., 2014. Bacteria and fungi from fish and other aquatic animals: A practical identification manual., II edition. ed. CABI.
- Cano-Gómez, A., Goulden, E.F., Owens, L., Høj, L., 2010. *Vibrio owensii* sp. nov., isolated from cultured crustaceans in Australia. *FEMS Microbiol. Lett.* 302, 175–181. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01850.x>
- Cano-Gomez, A., Høj, L., Owens, L., Andreakis, N., 2011. Multilocus sequence analysis provides basis for fast and reliable identification of *Vibrio harveyi*-related species and reveals previous misidentification of important marine pathogens. *Syst. Appl. Microbiol.* 34, 561–565. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2011.09.001>
- Chart, H., Trust, T.J., 1984. Characterization of the surface antigens of the marine fish pathogens *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*. *Can. J. Microbiol.* 30, 703–710. <https://doi.org/10.1139/m84-105>
- Chimetto, L.A., Cleenwerck, I., Alves, N., Silva, B.S., Brocchi, M., Willems, A., De Vos, P., Thompson, F.L., 2011. *Vibrio communis* sp. nov., isolated from the marine animals *Mussismilia hispida*, *Phyllogorgia dilatata*, *Palythoa caribaeorum*, *Palythoa variabilis* and *Litopenaeus vannamei*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 61, 362–368. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.019729-0>
- Clark, T.G., Cassidy-Hanley, D., 2005. Recombinant subunit vaccines: Potentials and constraints. *Dev. Biol. Stand.* 121, 153–163.
- Clem, L.W., Miller, N.W., Bly, J.E., 1991. Evolution of lymphocyte subpopulation, their interactions, and temperature sensitivities, in: Warr, G.W., Cohen, N. (Eds.), *Phylogenesis of Immune Functions*. CRC Press, Boca Raton.
- CLSI, 2014a. VET04-A2 Methods for broth dilution susceptibility testing of bacteria isolated from aquatic animals; Approved guidelines - Second edition.
- CLSI, 2014b. CLSI Supplement M100-S24 Performance standards for antimicrobial susceptibility testing., 24 th. ed. Wayne, PA.
- CLSI, 2012. CLSI document M07-A9. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard, Ninth Edition. ed. Wayne, PA.
- CLSI, 2011. Generation, presentation, and application of antimicrobial susceptibility test data for bacteria of animal origin; a report., in: CLSI Document VET05-R.

- CLSI, 2006. CLSI document VET03 Methods for antimicrobial disk susceptibility testing of bacteria isolated from aquatic animals, Vol. 26, No. 23. ed. Wayne, PA.
- Company, R., Sitja-Bobadilla, A., Pujalte, M.J., Garay, E., Alvarez-Pellitero, P., Perez-Sanchez, J., 1999. Bacterial and parasitic pathogens in cultured common dentex, *Dentex dentex* L. J. Fish Dis. 22, 299–309.
- Conejero, M.J.U., Hedreyda, C.T., 2003. Isolation of partial *toxR* gene of *Vibrio harveyi* and design of *toxR*-targeted PCR primers for species detection. J. Appl. Microbiol. 95, 602–611.
- Cossarini-Dunier, M., 1985. Effect of different adjuvants on the humoral immune response of rainbow trout. Dev Comp Immunol 9, 141–146.
- Cuesto, A., Esteban, M.A., 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. Mol. Immunol. 43, 1275–1285.
- Danilova, N., Bussmann, J., Jekosch, K., Steiner, L.A., 2005. The immunoglobulin heavy-chain locus in zebrafish: Identification and expression of a previously unknown isotype, immunoglobulin Z. Nat. Immunol. 6, 295–302.
- Del Gigia-Aguirre, L., Sánchez-Yebra-Romera, W., García-Muñoz, S., Rodríguez-Maresca, M., 2017. First description of wound infection with *Vibrio harveyi* in Spain. New Microbes New Infect. 19, 15-16. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2017.05.004>
- Diggles, B.K., Moss, G.A., Carson, J., Anderson, C.D., 2000. Luminous vibriosis in rock lobster *Jasus verreauxi* (Decapoda: Palinuridae) phyllosoma larvae associated with infection by *Vibrio harveyi*. Dis. Aquat. Organ. 43, 127–137. <https://doi.org/10.3354/dao043127>
- Dong, H.T., Taengphu, S., Sangsuriya, P., Charoensapsri, W., Phiwsaiya, K., Sornwatana, T., Khunrae, P., Rattanarajpong, T., Senapin, S., 2017. Recovery of *Vibrio harveyi* from scale drop and muscle necrosis disease in farmed barramundi, *Lates calcarifer* in Vietnam. Aquaculture 473, 89–96. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.02.005>
- Dorsch, M., Lane, D., Stackebrandt, E., 1992. Towards a Phylogeny of the Genus *Vibrio* Based on 16s rRNA Sequences. Int. J. Syst. Bacteriol. 42, 58–63.
- Duff, D.C.B., 1942. The oral immunization of trout against *Bacterium salmonicida*. J. Immunol. 44, 87–94.
- Ellis, A.E., 1988. General principles of fish vaccination, in: Ellis A. E. (Ed.), Fish Vaccination. Academic Press, London, pp. 1–19.
- Ellis, A.E., 1988. Optimizing factors for fish vaccination, in: A.E. Ellis (Ed.), Fish Vaccination. Academic Press, San Diego, California, pp. 32–46.
- Ellis, A.E., 1977. Ontogeny of the immune response in *Salmo salar*. Histogenesis of the lymphoid organs and appearance of membrane immunoglobulin and mixed leucocyte reactivity, in: J. B. Solomon and J. D. Horton (Ed.), Developmental Immunobiology. Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam, pp. 225–231.

- Esteban, M.Á., Muñoz, J., Meseguer, J., 2000. Blood cells of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). Flow cytometric and microscopic studies. *Anat. Rec.* 258, 80–89. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0185\(20000101\)258:1<80::AID-AR9>3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0185(20000101)258:1<80::AID-AR9>3.0.CO;2-I)
- Fillatreau, S., Six, A., Magadan, S., Castro, R., Sunyer, J.O., Boudinot, P., 2013. The astonishing diversity of Ig classes and B cell repertoires in teleost fish. *Front. Immunol.* 4. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00028>
- Florio, D., Balsamo, V., Gustinelli, A., Quaglio, F., Caffara, M., Zanoni, R.G., Fioravanti, M.L., 2012. Vibriosis da *Vibrio harveyi* in spigole (*Dicentrarchus labrax*) allevate in Italia. *Atti del XVIII Convegno Nazionale della Soc. Ital. Patol. Ittica S.I.P.I.* pp 22–22.
- 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. *J. Fish Dis.* 34, 643–661. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2011.01279.x>
- Galindo-Villegas, J., Mulero, V., 2014. Current Knowledge on the Development and Functionality of Immune Responses in the European Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*)., in: F. Javier Sanchez Vazquez, J.A.M.-C. (Ed.), *Biology of the European Sea Bass*. CRC Press, Boca Raton, pp. 342–373.
- Gauger, E.J., Gómez-Chiarri, M., 2002. 16S ribosomal DNA sequencing confirms the synonymy of *Vibrio harveyi* and *V. carchariae*. *Dis. Aquat. Organ.* 52, 39–46. <https://doi.org/10.3354/dao052039>
- Gomez-Gil, B., 2004. Molecular identification of *Vibrio harveyi*-related isolates associated with diseased aquatic organisms. *Microbiology* 150, 1769–1777. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26797-0>
- Goudenège, D., Boursicot, V., Versigny, T., Bonnetot, S., Ratiskol, J., Siquin, C., LaPointe, G., Le Rous, F., Roux, F. Le, Delbarre-Ladrat, C., 2014. Genome sequence of *Vibrio diabolicus* and identification of the exopolysaccharide HE800 biosynthesis locus. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 10165–10176. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6086-8>
- Grimes, D., Stemmler, J., Hada, H., May, E.B., Maneval, D., Hetrick, F.M., Jones, R.T., 1984. *Vibrio* species associated with mortality of sharks held in captivity. *Microb. Ecol.* 10, 271–282.
- Grimes, D.J., Gruber, S.H., May, E.B., 1985. Experimental infection of lemon sharks, *Negaprion brevirostris* (Poey), with *Vibrio* species. *J. Fish Dis.* 8, 173–180. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.1985.tb01212.x>
- Haenen, O.L.M., Fouz, B., Amaro, I., Isern, M.M., Mikkelsen, H., Travers, M.A., Zrncic, S., Renaults, T., Wardles, R., Hellstrom, A., Dalsgaard, I., 2014. WORKSHOP REPORT: Vibriosis in aquaculture. 16th EAAP Conference, Tampere, Finland. 4th September 2013. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* 34, 138–148.
- Haldar, S., Maharajan, A., Chatterjee, S., Hunter, S.A., Chowdhury, N., Hinenoya, A., Asakura, M., Yamasaki, S., 2010. Identification of *Vibrio harveyi* as a causative bacterium for a tail rot disease of sea bream *Sparus aurata* from research hatchery in Malta. *Microbiol. Res.* 165, 639–648. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2009.12.001>
- Hamid, L.M.O., 2003. Vaccination of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) against atypical

- furunculosis using different adjuvants. Master's Thesis. University of Tromso, Norway.
- Han, Y.-L., Hou, C.-C., Du, C., Zhu, J.-Q., 2017. Molecular cloning and expression analysis of five heat shock protein 70 (HSP70) family members in *Lateolabrax maculatus* with *Vibrio harveyi* infection. *Fish Shellfish Immunol.* 60, 299–310. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.11.056>
- Hansen, J.D., Landis, E.D., Phillips, R.B., 2005. Discovery of a unique Ig heavy-chain isotype (IgT) in rainbow trout: Implications for a distinctive B cell developmental pathway in teleost fish. *Proc. Natl. Acad. Sci. United States Am.* 102, 6919–6924.
- Harikrishnan, R., Balasundaram, C., Heo, M.-S., 2012. Effect of *Inonotus obliquus* enriched diet on hematology, immune response, and disease protection in kelp grouper, *Epinephelus bruneus* against *Vibrio harveyi*. *Aquaculture* 344–349, 48–53. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.03.010>
- Hashem, M., El-Barbary, M., 2013. *Vibrio harveyi* infection in Arabian Surgeon fish (*Acanthurus sohal*) of Red Sea at Hurghada, Egypt. *Egypt. J. Aquat. Res.* 39, 199–203. <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2013.10.006>
- Hispano, C., Nebra, Y., Blanch, A.R., 1997. Isolation of *Vibrio harveyi* from an ocular lesion in the short sunfish (*Mola mola*). *Bull Eur Assoc Fish Pathol* 17, 104–107.
- Horne, M.T., Roberts, R.J., Tatner, M., Ward, P., 1984. The effects of the use of potassium alum adjuvant in vaccines against vibriosis in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *J. Fish Dis.* 7, 91–99. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.1984.tb00911.x>
- Hu, Y., Deng, T., Sun, B., Sun, L., 2012. Development and efficacy of an attenuated *Vibrio harveyi* vaccine candidate with cross protectivity against *Vibrio alginolyticus*. *Fish Shellfish Immunol.* 32, 1155–1161. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.03.032>
- Hu, Y., Sun, L., 2011. A bivalent *Vibrio harveyi* DNA vaccine induces strong protection in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Vaccine* 29, 4328–4333. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.04.021>
- Ishimaru, K., Muroga, K., 1997. Taxonomical Re-examination of Two Pathogenic *Vibrio* Species Isolated from Milkfish and Swimming Crab. *Fish Pathol.* 32, 59–64. <https://doi.org/10.3147/jsfp.32.59>
- Iwamoto, Y., Suzuki, Y., Kurita, A., Watanabe, Y., Shimizu, T., Ohgami, H., Yanagihara, Y., 1995. *Vibrio trachuri* sp. nov., a new species isolated from diseased Japanese horse mackerel. *Microbiol. Immunol.* 39, 831–837. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.1995.tb03274.x>
- Jenner, E., 1798. An enquiry into the causes and effects of variolae vaccinae, a disease discovered in some Western countries of England, particularly Gloucestershire and known by the name of Cow Pox. reprinted by Cassell, London, 1896.
- Johnson, F.H., Shunk, I. V., 1936. An Interesting New Species of Luminous Bacteria. *J. Bacteriol.* 31, 585–593.
- Jósefsson, S., Tatner, M.F., 1993. Histogenesis of the lymphoid organs in sea bream (*Sparus aurata* L.). *Fish Shellfish Immunol.* 3, 35–49.

- Jun, J.W., Bastías, R., Kutateladze, M., Tediashvilli, M., Kalatzis, P., Chen Park, S., Katharios, P., 2014. *Vibrio harveyi* infection in cultured common dentex (*Dentex dentex*) and greater amberjack (*Seriola dumerili*) and isolation of *Vibrio* bacteriophage, in: Oxford Bacteriophages Conference, Phages. Oxford.
- Kang, C.-H., Kim, Y., Oh, S.J., Mok, J.-S., Cho, M.-H., So, J.-S., 2014. Antibiotic resistance of *Vibrio harveyi* isolated from seawater in Korea. Mar. Pollut. Bull. 86, 261–265. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.07.008>
- Kim, Y.B., Okuda, J., Matsumoto, C., Takahashi, N., Hashimoto, S., Nishibuchi, M., 1999. Identification of *Vibrio parahaemolyticus* at the species level by PCR targeted to the *toxR* gene. J. Clin. Microbiol. 37, 1172–1177.
- Koppenheffer, T.L., 1987. Serum complement systems of ectothermic vertebrates. Dev. Comp. Immunol. 11, 279–286.
- Korun, J., 2008. Marine vibrios associated with diseased sea bass (*Dicentrarchus labrax*) in Turkey. J. Fish. Sci. 2, 66–76. <https://doi.org/10.3153/jfscom.2008007>
- Kraxberger-Beatty, T., McGarey, D.J., Grier, H.J., Lim, D. V., 1990. *Vibrio harveyi*, an opportunistic pathogen of common snook, *Centropomus undecimalis* (Bloch), held in captivity. J. Fish Dis. 13, 557–560.
- Lee, K.K., Liu, P.C., Chuang, W.H., 2002. Pathogenesis of Gastroenteritis Caused by *Vibrio carchariae* in Cultured Marine Fish. Mar. Biotechnol. 4, 267–277. <https://doi.org/10.1007/s10126-002-0018-9>
- Liu, L., Ge, M., Zheng, X., Tao, Z., Zhou, S., Wang, G., 2016. Investigation of *Vibrio alginolyticus*, *V. harveyi*, and *V. parahaemolyticus* in large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea* (Richardson) reared in Xiangshan Bay, China. Aquac. Reports 3, 220–224. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2016.04.004>
- Liu, M.A., 2003. DNA vaccines: A review. J. Intern. Med. 253, 402–410.
- Liu, P.-C., Chuang, W.-H., Lee, K.-K., 2003. Infectious gastroenteritis caused by *Vibrio harveyi* (*V. carchariae*) in cultured red drum, *Sciaenops ocellatus*. J. Appl. Ichthyol. 19, 59–61. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0426.2003.00356.x>
- Liu, P.-C., Lin, J.-Y., Chuang, W.-H., Lee, K.-K., 2004. Isolation and characterization of pathogenic *Vibrio harveyi* (*V. carchariae*) from the farmed marine cobia fish *Rachycentron canadum* L. with gastroenteritis syndrome. World J. Microbiol. Biotechnol. 20, 495–499. <https://doi.org/10.1023/B:WIBI.0000040402.44340.0e>
- Liu, P.C., Lee, K.K., Yii, K.C., Kou, G.H., Chen, S.N., 1996. Isolation of *Vibrio harveyi* from diseased kuruma prawns *Penaeus japonicus*. Curr. Microbiol. 33, 129–132. <https://doi.org/10.1007/s002849900087>
- Liu, P.V., 1957. Survey of hemolysin production among species of *Pseudomonas*. J. Bacteriol. 74, 51–53.
- López, J.R., de la Roca, E., Núñez, S., de la Herran, R., Navas, J.I., Manchado, M., Herrera, M., Toranzo, A.E., 2009. Identification of *Vibrio harveyi* isolated from diseased cultured wedge sole *Dicologlossa cuneata*. Dis. Aquat. Organ. 84, 209–217.



<https://doi.org/10.3354/dao02045>

- Luna, G.M., Bongiorno, L., Gili, C., Biavasco, F., Danovaro, R., 2009. *Vibrio harveyi* as a causative agent of the White Syndrome in tropical stony corals. *Environ. Microbiol. Rep.* 2, 120–127. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2009.00114.x>
- Magnadottir, B., 1998. Comparison of immunoglobulin (IgM) from four fish species. *Icelandic Agric. Sci.* 12, 47–59.
- Makemson, J.C., Hermosa Jr, G. V, 1999. Luminous bacteria cultured from fish guts in the Gulf of Oman. *Luminescence* 14, 161–168.
- Mancin, M., Beato, M., Ricci, A., 2010. Statistical methods for the calculation of vaccine PD50, in: 28th Annual Meeting of the Society for Veterinary Epidemiology and Preventive Medicine (SVEMP). Nantes, FR.
- Marco-Noales, E., Biosca, E.G., Amaro, C., 1999. Effects of Salinity and Temperature on Long-Term Survival of the Eel Pathogen *Vibrio vulnificus* Biotype 2 (Serovar E). *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 1117–1126.
- Mikkelsen, H., Schroder, M.B., Lund, V., 2004. Vibriosis and atypical furunculosis vaccines: Efficacy, specificity and side effects in Atlantic cod, *Gadus morhua* L. *Aquaculture* 242, 81–91.
- Miller, S.D., Haddock, S.H.D., Elvidge, C.D., Lee, T.F., 2005. Detection of a bioluminescent milky sea from space. *PNAS* 102, 14181–14184.
- Miller, V.L., Mekalanos, J.J., 1984. Synthesis of cholera toxin is positively regulated at the transcriptional level by *toxR*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 3471–3475.
- Minami, T., Iwata, K., Shimahara, Y., Yuasa, K., 2016. *Vibrio harveyi* Infection in Farmed Greater Amberjack *Seriola dumerili*. *Fish Pathol.* 51, 1–7. <https://doi.org/10.3147/jsfp.51.1>
- Mohajeri, J., Afsharnasab, M., Jalali, B., Kakoolaki, S., Sharifrohani, M., Haghghi, A., 2011. Immunological and histopathological changes in *Penaeus semisulcatus* challenged with *Vibrio harveyi*. *Iran. J. Fish. Sci.* 10, 254–265.
- Mohi, M.M., Kuratani, M., Miyazaki, T., Yoshida, T., 2010. Histopathological studies on *Vibrio harveyi*-infected tiger puffer, *Takifugu rubripes* (Temminck et Schlegel), cultured in Japan. *J. Fish Dis.* 33, 833–840. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2010.01184.x>
- Musa, N., Wei, L.S., Wee, W., 2008. Phenotypic and genotypic characteristics of *Vibrio harveyi* isolated from black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Image (Rochester, N.Y.)* 3, 885–902.
- Mutinelli, F., Bozza, M.A., Basilicata, L., Bovo, G., 1998. Diagnosi istologica ed immunoistochimica della Encefaloretinopatia virale della spigola di allevamento (*Dicentrarchus labrax*). *Boll. Soc. Ital. Patol. Ittica* 23, 1–10.
- Nakanishi, T., Kiryu, I., Ototake, M., 2002. Development of a new vaccine delivery method for fish: Percutaneous administration by immersion with application of a multiple

- puncture instrument. *Vaccine* 20, 3764–3769.
- Nakao, M., Kajiya, T., Sato, Y., Somamoto, T., Kato-Unoki, Y., Matsushita, M., Nakata, M., Fujita, T., Yano, T., 2006. Lectin Pathway of Bony Fish Complement: Identification of Two Homologs of the Mannose-Binding Lectin Associated with MASP2 in the Common Carp (*Cyprinus carpio*). *J. Immunol.* 177, 5471–5479. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.8.5471>
- Nguyen, H.T., Thu Nguyen, T.T., Tsai, M.-A., Ya-Zhen, E., Wang, P.-C., Chen, S.-C., 2017. A formalin-inactivated vaccine provides good protection against *Vibrio harveyi* infection in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). *Fish Shellfish Immunol.* 65, 118–126. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.04.008>
- Nicolas, J.L., Basuyaux, O., Mazurié, J., Thébault, A., 2002. *Vibrio carchariae*, a pathogen of the abalone *Haliotis tuberculata*. *Dis. Aquat. Organ.* 50, 35–43. <https://doi.org/10.3354/dao050035>
- Ningqiu, L., Junjie, B., Shuqin, W., Xiaozhe, F., Haihua, L., Xing, Y., Cunbin, S., 2008. An outer membrane protein, OmpK, is an effective vaccine candidate for *Vibrio harveyi* in Orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). *Fish Shellfish Immunol.* 25, 829–833. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2008.09.007>
- Nishimori, E., Huasegawa, O., Numata, T., Wakabayashi, H., 1998. *Vibrio carchariae* causes mass mortalities in Japanese abalone, *Sulculus diversicolor supratexta*. *Fish Pathol.* 33, 495–502.
- Oh, M.-J., Kim, W.-S., Kitamura, S.-I., Lee, H., Son, B.W., Jung, T.-S., Jung, S.-J., 2006. Change of pathogenicity in Olive flounder *Paralichthys olivaceus* by co-infection of *Vibrio harveyi*, *Edwardsiella tarda* and marine birnavirus. *Aquaculture* 257, 156–160. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.03.009>
- Okuda, J., Nakai, T., Chang, P.S., Oh, T., Nishino, T., Koitabashi, T., Nishibuchi, M., 2001. The *toxR* gene of *Vibrio (Listonella) anguillarum* controls expression of the major outer membrane proteins but not virulence in a natural host model. *Infect. Immun.* 69, 6091–6101.
- Pakingking, R.J., Bautista, N.B., Catedral, D., de Jesus-Ayson, E.G., 2018. Characterization of *Vibrio* isolates recovered from the eye of cage-cultured pompano (*Trachinotus blochii*) infested with caligid parasites (*Lepeophtheirus spinifer*). *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* 38, 35–41.
- Palić, D., Ostojić, J., Andreasen, C.B., Roth, J.A., 2007. Fish cast NETs: Neutrophil extracellular traps are released from fish neutrophils. *Dev. Comp. Immunol.* 31, 805–816.
- Pang, L., Zhang, X.-H., Zhong, Y., Chen, J., Li, Y., Austin, B., 2006. Identification of *Vibrio harveyi* using PCR amplification of the *toxR* gene. *Lett. Appl. Microbiol.* 43, 249–255. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.01962.x>
- Pascoli, F., Serra, M., Toson, M., Pretto, T., Toffan, A., 2016. Betanodavirus ability to infect juvenile European sea bass, *Dicentrarchus labrax*, at different water salinity. *J. Fish Dis.* 39, 1061–1068. <https://doi.org/10.1111/jfd.12440>

- Pascual, J., Macián, M.C., Arahal, D.R., Garay, E., Pujalte, M.J., 2010. Multilocus sequence analysis of the central clade of the genus *Vibrio* by using the 16S rRNA, *recA*, *pyrH*, *rpoD*, *gyrB*, *rctB* and *toxR* genes. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60, 154–65. <https://doi.org/10.1099/ijss.0.010702-0>
- Pasharawipas, T., Sriurairatana, S., Direkbusarakom, S., Donayadol, Y., Thaikua, S., Ruangpan, L., Flegel, T.W., 1998. Luminous *Vibrio harveyi* Associated with Tea Brown Gill Syndrome in Black Tiger Shrimp. *Luminescence*, 2–5.
- Pass, D.A., Dybdahl, R., Mannion, M.M., 1987. Investigations into the causes of mortality of the pearl oyster, *Pinctada maxima* (Jamson), in Western Australia. *Aquaculture* 65, 149–169. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(87\)90259-6](https://doi.org/10.1016/0044-8486(87)90259-6)
- Pavia, A.T., Bryan, J.A., Maher, K.L., Roderick Hester, T., Farmer, J.J., 1989. *Vibrio carchariae* infection after a shark bite. *Ann Intern Med.* 111, 85–86. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-111-1-85>
- Pedersen, K., Verdonck, L., Austin, B., Austin, D.A., Blanch, A.R., Grimont, P.A.D., Jofre, J., Koblavi, S., Larsen, J.L., Tiainen, T., Vigneulle, M., Swings, J., 1998. Taxonomic evidence that *Vibrio carchariae* Grimes et al. 1985 is a junior synonym of *Vibrio harveyi* (Johnson and Shunk 1936) Baumann et al. 1981. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48, 749–758. <https://doi.org/10.1099/00207713-48-3-749>
- Pena, L.D. de la, Lavilla-Pitogo, C.R., Paner, M.G., 2001. Luminescent Vibrios Associated with Mortality in Pond-Cultured Shrimp *Penaeus monodon* in the Philippines: Species Composition. *Fish Pathol.* 36, 133–138. <https://doi.org/10.3147/jsfp.36.133>
- Picchietti, S., Guerra, L., Buonocore, F., Randelli, E., Fausto, A.M., Abelli, L., 2009. Lymphocyte differentiation in sea bass thymus: CD4 and CD8- $\alpha$  gene expression studies. *Fish Shellfish Immunol.* 27, 50–56.
- Picchietti, S., Guerra, L., Selleri, L., Buonocore, F., Abelli, L., Scapigliati, L., Mazzini, M., Faeusto, A.M., 2008. Compartmentalisation of T cells expressing CD8 $\alpha$  and TCR $\beta$  in developing thymus of sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.). *Dev. Comp. Immunol.* 32, 92–99.
- Picchietti, S., Terribili, F.R., Mastrolia, L., Scapigliati, G., Abelli, L., 1997. Expression of lymphocyte antigenic determinants in developing gut-associated lymphoid tissue of the sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.). *Anat. Embryol. (Berl)*. 196, 457–463.
- Pizzutto, M., Hirst, R., 1995. Classification of isolates of *Vibrio harveyi* virulent to *Penaeus monodon* larvae by protein profile analysis and M13 DNA fingerprinting. *Dis. Aquat. Organ.* 21, 61–68. <https://doi.org/10.3354/dao021061>
- Pridgeon, J.W., Klesius, P.H., 2012. Major bacterial diseases in aquaculture and their vaccine development. *CAB Rev. Perspect. Agric. Vet. Sci. Nutr. Nat. Resour.* 7. <https://doi.org/10.1079/PAVSNNR20127048>
- Pujalte, M.J., Sitjà-Bobadilla, A., Macián, M.C., Belloch, C., Álvarez-Pellitero, P., Pérez-Sánchez, J., Uruburu, F., Garay, E., 2003. Virulence and molecular typing of *Vibrio harveyi* strains isolated from cultured dentex, gilthead sea bream and european sea bass. *Syst. Appl. Microbiol.* 26, 284–292. <https://doi.org/10.1078/072320203322346146>

- Qin, Y.X., Wang, J., Su, Y.Q., Wang, D.X., Chen, X.Z., 2006. Studies on the pathogenic bacterium of ulcer disease in *Epinephelus awoara*. *Acta Ocean. Sin.* 25, 154–159.
- Raj, S.T., Lipton, A.P., Chauhan, G.S., 2010. Characterization and infectivity evaluation of *Vibrio harveyi* causing white patch disease among captive reared seahorses, *Hippocampus kuda*. *Indian J. Mar. Sci.* 39, 151–156.
- Ramesh, A., Venugopalan, V.K., 1989. Response of enteric luminous bacteria to environmental conditions in the gut of the fish. *J Appl Bacteriol* 66, 529–533.
- Rampazzo, E., 2003. Titolazione di anticorpi nei confronti di *Vibrio anguillarum* in siero di branzino (*Dicentrarchus labrax*) mediante ELISA indiretta. Tesi magistrale - Università degli Studi di Padova.
- Ransangan, J., Lal, T.M., Al-Harbi, A.H., 2012. Characterization and Experimental Infection of *Vibrio harveyi* Isolated from Diseased Asian Seabass (*Lates calcarifer*). *Malays. J. Microbiol.* 8, 104 - 115. <https://doi.org/10.21161/mjm.03512>
- Rebl, A., Goldammer, T., Seyfert, H.-M., 2010. Toll-like receptor signaling in bony fish. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 134, 139–150. <https://doi.org/10.1016/J.VETIMM.2009.09.021>
- Rivera-Posada, J.A., Pratchett, M., Cano-Gomez, A., Arango-Gomez, J.D., Owens, L., 2011. Refined identification of *Vibrio* bacterial flora from *Acanthasther planci* based on biochemical profiling and analysis of housekeeping genes. *Dis. Aquat. Organ.* 96, 113–123. <https://doi.org/10.3354/dao02389>
- Robertson, P.A.W., Calderon, J., Carrera, L., Stark, J.R., Zherdmant, M., Austin, B., 1998. Experimental *Vibrio harveyi* infections in *Penaeus vannamei* larvae. *Dis. Aquat. Organ.* 32, 151–155.
- Rombout, J.H.W.M., Yang, G., Kiron, V., 2014. Adaptive immune responses at mucosal surfaces of teleost fish. *Fish Shellfish Immunol.* 40, 634–643. <https://doi.org/10.1016/J.FSI.2014.08.020>
- Saeed, M.O., 1995. Association of *Vibrio harveyi* with mortalities in cultured marine fish in Kuwait. *Aquaculture* 136, 21–29. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(95\)01045-9](https://doi.org/10.1016/0044-8486(95)01045-9)
- Sakai, M., 1999. Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture* 172, 63–92.
- Santos, Y., Laixier, R., Bandin, I., Lamas, J., Toranzo, A.E., 1991a. Susceptibility of turbot (*Scophthalmus maximus*), coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*), and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to strains of *Vibrio anguillarum* and their exotoxins. *J. Appl. Ichthyol.* 7, 160–167. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.1991.tb00522.x>
- Santos, Y., Bandin, I., Nunez, S., Gravningen, K., Toranzo, A.E., 1991b. Protection of turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), and rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Richardson), against vibriosis using two different vaccines. *J. Fish Dis.* 14, 407–411. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.1991.tb00840.x>
- Sawabe, T., Kita-Tsukamoto, K., Thompson, F.L., 2007. Inferring the Evolutionary History of Vibrios by Means of Multilocus Sequence Analysis. *J. Bacteriol.* 189, 7932–7936.

- Sawabe, T., Ogura, Y., Matsumura, Y., Feng, G., Amin, A.R., Mino, S., Nakagawa, S., Sawabe, T., Kumar, R., Fukui, Y., Satomi, M., Matsushima, R., Thompson, F.L., Gomez-Gil, B., Christen, R., Maruyama, F., Kurokawa, K., Hayashi, T., 2013. Updating the *Vibrio* clades defined by multilocus sequence phylogeny: proposal of eight new clades, and the description of *Vibrio tritonius* sp. nov. *Front. Microbiol.* 4, 414, 1-14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00414>
- Schroder, M.B., Villena, A.J., Jorgensen, T.O., 1998. Ontogeny of lymphoid organs and immunoglobulin producing cells in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Dev. Comp. Immunol.* 22, 507–517.
- Secombes, C.J., 1996. The nonspecific immune system: Cellular defenses., in: G. Iwama and T. Nakanishi (Ed.), *The Fish Immune System: Organism, Pathogen and Environment.* . Academic Press, San Diego, USA, pp. 63–103.
- Sethi, S., Murphy, T.F., Klingman, K.L., 1996. Diagnosis, epidemiology and pathogenesis of bacterial infections in the molecular era. *Clin. Mol. Pathol.* 49, M1–M7.
- Shen, G.M., Shi, C.Y., Fan, C., Jia, D., Wang, S.Q., Xie, G.S., Li, G.Y., Mo, Z.L., Huang, J., 2017. Isolation, identification and pathogenicity of *Vibrio harveyi*, the causal agent of skin ulcer disease in juvenile hybrid groupers *Epinephelus fuscoguttatus* × *Epinephelus lanceolatus*. *J. Fish Dis.* 40, 1351–1362. <https://doi.org/10.1111/jfd.12609>
- Singhal, N., Kumar, M., Kanaujia, P.K., Viridi, J.S., 2015. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Front. Microbiol.* 6, 791. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00791>
- Snieszko, S., Piotrowska, W., Kocylowski, B.M.K., 1938. Badania bakteriologiczne nad bakteriami posocznicy karpia, Memoires de l'Institut d'Ichthyologie et Pisciculture de la Station de Pisciculture Experimentale a Mydlniki de l'Universite Jagiellonienne a Cracovie.
- Soffientino, B., Gwaltney, T., Nelson, D.R., Specker, J.L., Mael, M., Gómez-Chiarri, M., 1999. Infectious necrotizing enteritis and mortality caused by *Vibrio carchariae* in summer flounder *Paralichthys dentatus* during intensive culture. *Dis. Aquat. Organ.* 38, 201–210. <https://doi.org/10.3354/dao038201>
- Soto-Rodriguez, S.A., Gomez-Gil, B., Lozano, R., 2010. “Bright-red” syndrome in Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* is caused by *Vibrio harveyi*. *Dis. Aquat. Organ.* 92, 11–19. <https://doi.org/10.3354/dao02274>
- Stenvik, J., Schroder, M.B., Olsen, K., Zapata, A., Jorgensen, T.O., 2001. Expression of immunoglobulin heavy chain transcripts (VH-families, IgM, and IgD) in head kidney and spleen of the Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Dev. Comp. Immunol.* 25, 291–302.
- Stephens, F.J., Raidal, S.R., Buller, N., Jones, B., 2006. Infection with *Photobacterium damsela* subspecies *damsela* and *Vibrio harveyi* in snapper, *Pagrus auratus* with bloat. *Aust. Vet. J.* 84, 173–177. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.2006.tb12774.x>
- Stowasser, M., Bachmann, A.W., Tunny, T.J., Gordon, R.D., 2008. Production of 18-oxo-cortisol in subtypes of primary aldosteronism. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 23, 591–593. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.08.013>

- Sun, B., Zhang, X.-H., Tang, X., Wang, S., Zhong, Y., Chen, J., Austin, B., 2007. A Single Residue Change in *Vibrio harveyi* Hemolysin Results in the Loss of Phospholipase and Hemolytic Activities and Pathogenicity for Turbot (*Scophthalmus maximus*). J. Bacteriol. 189, 2575–2579. <https://doi.org/10.1128/JB.01650-06>
- Suner, O., Tort, L., 1994. The Complement System of the Teleost Fish *Sparus aurata*. Ann. N. Y. Acad. Sci. 712, 371–373. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1994.tb33598.x>
- Sunyer, J.O., Tort, L., 1995. Natural hemolytic and bactericidal activities of sea bream *Sparus aurata* serum are effected by the alternative complement pathway. Vet. Immunol. Immunopathol. 45, 333–345.
- Tagomori, K., Lida, T., Honda, T., 2002. Comparison of genome structures of vibrios, bacteria possessing two chromosomes. J. Bacteriol. 184, 4351–4358.
- Tall, A., Hervio-Heath, D., Teillon, A., Boisset-Helbert, C., Delesmont, R., Bodilis, J., Touron-Bodilis, A., 2013. Diversity of *Vibrio* spp. isolated at ambient environmental temperature in the Eastern English Channel as determined by *pyrH* sequencing. J. Appl. Microbiol. 114, 1713–1724. <https://doi.org/10.1111/jam.12181>
- Tamura, K., Peterson, D., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S., 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Mol. Biol. Evol. 28, 2731–2739. <https://doi.org/10.1093/molbev/msr121>
- Tatner, M.F., Horne, M.T., 1983. Factors influencing the uptake of <sup>14</sup>C-labelled *Vibrio anguillarum* vaccine in direct immersion experiments with rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. J. Fish Biol. 22, 585–591. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1983.tb04218.x>
- Tatner, M.F., Manning, M.J., 1983. The ontogeny of cellular immunity in the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, in relation to the stage of development of the lymphoid organs. Dev Comp Immunol 7, 69–75.
- Tendencia, E.A., 2002. *Vibrio harveyi* isolated from cage-cultured seabass *Lates calcarifer* Bloch in the Philippines. Aquac. Res. 33, 455–458. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.2002.00688.x>
- Thompson, F.L., Gevers, D., Thompson, C.C., Dawyndt, P., Naser, S., Hoste, B., Munn, C.B., Swings, J., 2005. Phylogeny and molecular identification of vibrios on the basis of multilocus sequence analysis. Appl. Environ. Microbiol. 71, 5107–5115. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.9.5107-5115.2005>
- Thompson, F.L., Hoste, B., Denys, R., Swings, J., Vandemeulebroecke, K., Engelbeen, K., 2002. *Vibrio trachuri* Iwamoto et al. 1995 is a junior synonym of *Vibrio harveyi* (Johnson and Shunk 1936) Baumann et al. 1981. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 52, 973–976. <https://doi.org/10.1099/00207713-52-3-973>
- Thompson, F.L., Lida, T., Swings, J., 2004. Biodiversity of vibrios. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 68, 403–431.
- Tu, Z., Li, H., Zhang, X., Sun, Y., Zhou, Y., 2017. Complete genome sequence and comparative genomics of the golden pompano (*Trachinotus ovatus*) pathogen, *Vibrio*

*harveyi* strain QT520. PeerJ 5, e4127. <https://doi.org/10.7717/peerj.4127>

- Twort, F.W., 1924. An improved neutral red, light green double stain for staining animal parasites, microorganisms and tissues. *J. State Med.* 32, 351.
- Urbanczyk, H., Ogura, Y., Hayashi, T., 2013. Taxonomic revision of *Harveyi* clade bacteria (family Vibrionaceae) based on analysis of whole genome sequences. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 63, 2742–2751. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.051110-0>
- van Belkum, A., Welker, M., Pincus, D., Charrier, J.P., Girard, V., 2017. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry in Clinical Microbiology: What Are the Current Issues? *Ann. Lab. Med.* 37, 475–483. <https://doi.org/10.3343/alm.2017.37.6.475>
- Vidgen, M., Carson, J., Higgins, M., Owens, L., 2006. Changes to the phenotypic profile of *Vibrio harveyi* when infected with the *Vibrio harveyi* myovirus-like (VHML) bacteriophage. *J. Appl. Microbiol.* 100, 481–487.
- Wang, Y., Barton, M., Elliott, L., Li, X., Abraham, S., O’Dea, M., Munro, J., 2017. Bacteriophage therapy for the control of *Vibrio harveyi* in greenlip abalone (*Haliotis laevis*). *Aquaculture* 473, 251–258. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.01.003>
- Weide, T., Herrmann, L., Bockau, U., Niebur, N., Aldag, I., Laroy, W., Contreras, R., Tiedtke, A., Hartmann, M.W.W., 2006. Secretion of functional human enzymes by *Tetrahymena thermophila*. *BMC Biotechnol.* 6, 19. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-6-19>
- Wilkins, S., Millar, M., Hemsworth, S., Johnson, G., Warwick, S., Pizer, B., 2008. *Vibrio harveyi* sepsis in a child with cancer. *Pediatr. Blood Cancer* 50, 891–892. <https://doi.org/10.1002/pbc.21356>
- Won, K.M., Kim, K.H., Park, S. Il, 2009. *Vibrio harveyi* associated with deep skin ulcer in river puffer, *Takifugu obscurus*, exhibited in a public aquarium. *Aquac. Res.* 40, 963–967. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2008.02151.x>
- Yano, T., 1996. The Nonspecific Immune System: Humoral Defense, in: Iwama, G., Nakanishi, T. (Eds.), *The Fish Immune System: Organism, Pathogens and Environment*. Academic Press, San Diego, USA, pp. 106–140.
- Ye, J., Kaattari, I.M., Kaattari, S.L., 2011. The differential dynamics of antibody subpopulation expression during affinity maturation in a teleost. *Fish Shellfish Immunol.* 30, 372–377.
- Yetinson, T., Shilo, M., 1979. Seasonal and Geographic Distribution of Luminous Bacteria in the Eastern Mediterranean Sea and the Gulf of Eilat. *Appl. Environ. Microbiol.* 37, 1230–1238.
- Yii, K.C., Yang, T.I., Lee, K.K., 1997. Isolation and characterization of *Vibrio carchariae*, a causative agent of gastroenteritis in the groupers, *Epinephelus coioides*. *Curr. Microbiol.* 35, 109–115.
- Yoshizawa, S., Tsuruya, Y., Fukui, Y., Sawabe, T., Yokota, A., Kogure, K., Higgins, M.,

- Carson, J., Thompson, F.L., 2012. *Vibrio jasicida* sp. nov., a member of the *Harveyi* clade, isolated from marine animals (packhorse lobster, abalone and Atlantic salmon). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 62, 1864–70. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.025916-0>
- Yoshizawa, S., Wada, M., Kita-Tsukamoto, K., Ikemoto, E., Yokota, A., Kogure, K., 2009. *Vibrio azureus* sp. nov., a luminous marine bacterium isolated from seawater. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59, 1645–1649. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.004283-0>
- Yoshizawa, S., Wada, M., Yokota, A., Kogure, K., 2010. *Vibrio sagamiensis* sp. nov., luminous marine bacteria isolated from sea water. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 56, 499–507.
- Zapata, A.G., Chiba, A., Varas, A., 1996. Cells and Tissues of the Immune System of Fish, in: Iwama George and Nakanishi Teruyuki (Ed.), *The Fish Immune System: Organism, Pathogen, and Environment*. Academic Press, San Diego, USA, pp. 1–53.
- Zapata, A.G., Cooper, E.L., 1990. *The immune system: comparative histophysiology*. John Wiley and Sons, Chichester.
- Zhang, W.W., Sun, K., Cheng, S., Sun, L., 2008. Characterization of DegQVh, a serine protease and a protective immunogen from a pathogenic *Vibrio harveyi* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 6254–6262. <https://doi.org/10.1128/AEM.00109-08>
- Zhang, X.-H., Austin, B., 2000. Pathogenicity of *Vibrio harveyi* to salmonids. *J. Fish Dis.* 23, 93–102. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.2000.00214.x>
- Zhang, X.H., Meaden, P.G., Austin, B., 2001. Duplication of hemolysin genes in a virulent isolate of *Vibrio harveyi*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 3161–3167. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.7.3161-3167.2001>
- Zhu, K., Chi, Z., Li, J., Zhang, F., Li, M., Yasoda, H.N., Wu, L., 2006. The surface display of haemolysin from *Vibrio harveyi* on yeast cells and their potential applications as live vaccine in marine fish. *Vaccine* 24, 6046–6052. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.05.043>
- Zhu, L.Y., Lin, A.F., Shao, T., Nie, L., Dong, W.R., Xiang, L.X., Shao, J.Z., 2014. B Cells in Teleost Fish Act as Pivotal Initiating APCs in Priming Adaptive Immunity: An Evolutionary Perspective on the Origin of the B-1 Cell Subset and B7 Molecules. *J. Immunol.* 2699–2714. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301312>
- Zhu, Z.M., Dong, C.F., Weng, S.P., He, J.G., 2018. The high prevalence of pathogenic *Vibrio harveyi* with multiple antibiotic resistance in scale drop and muscle necrosis disease of the hybrid grouper, *Epinephelus fuscoguttatus* (♀) × *E. lanceolatus* (♂), in China. *J. Fish Dis.* 41, 589–601. <https://doi.org/10.1111/jfd.12758>
- Zorrilla, I., Arijo, S., Chabrillon, M., Diaz, P., Martinez-Manzanares, E., Balebona, M.C., Morinigo, M.A., 2003. *Vibrio* species isolated from diseased farmed sole, *Solea senegalensis* (Kaup), and evaluation of the potential virulence role of their extracellular products. *J. Fish Dis.* 26, 103–108. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.2003.00437.x>



APPENDICE A

Assegnazione iniziale di specie Riferimento bibliografico	SPECIE ITTICHE														CROSTACEI			MOLLUSCHI	
	<i>F. trachuri</i> Iwamoto et al., 1955	<i>F. harveyi</i> Ishimaru e Muroga, 1997	<i>F. carabiarum</i> Sofianatos et al., 1999	<i>F. harveyi</i> Tendelena, 2002	<i>F. harveyi</i> Liu et al., 2004	<i>F. harveyi</i> Konn, 2008	<i>F. harveyi</i> Lopez et al., 2009	<i>F. harveyi</i> Hilber et al., 2010	<i>F. harveyi</i> Raj et al., 2010	<i>F. harveyi</i> Bousnagan et al., 2012	<i>F. harveyi</i> Minami et al., 2016	<i>F. harveyi</i> Shen et al., 2017	<i>F. harveyi</i> Pakudvirata et al., 2018	<i>F. harveyi</i> Misa et al., 2008	<i>F. harveyi</i> De la Sosa et al., 2001	<i>F. harveyi</i> Diggle et al., 2000	<i>F. carabiarum</i> Nicholas et al., 2002	<i>F. harveyi</i> Nishimori et al., 1998	
Specie di isolamento	<i>Trachurus japonicus</i>	<i>Chanos chanos</i>	<i>Pandalichthys dentatus</i>	<i>Lates calcarifer</i>	<i>Rachicentrum canadum</i>	<i>Dicentrarchus labrax</i>	<i>Dicologlossa cuneata</i>	<i>Sparus aurata</i>	<i>Hippocampus kuda</i>	<i>Lates calcarifer</i>	<i>Seriola dumerilii</i>	<i>Epinephelus fuscoguttatus</i> (♂) x <i>E. lanceolatus</i> (♀)	<i>Trachinotus bleekeri</i>	<i>Penaeus monodon</i>	<i>Penaeus monodon</i>	<i>Halobius tuberculatus</i>	<i>Silvanus diversicolor</i>	<i>Supratetra</i>	
Coltivazione	30°C	28°C	28°C - 48h	/	30°C - 24h	22°C - 24h	20°C	/	28°C	28°C - 24h	25°C	28°C	28°C - 24h	28°C	20°C	20°C	25°C - 24h	20°C	
Sciamante su FSA (2% NaCl)	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	
Luminescenza	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	
Crescita in TCBS	Giallo	Giallo	Giallo	Verde	Giallo	Giallo/Verde	Giallo/Verde	Verde	Verde	Giallo	Giallo	Giallo	Verde	V (Verde 85%)	Verde	Verde	Verde	Verde	
O/129 (150 µg)	S	/	S	S	S	R	R	R	S	/	/	/	S	S	S	S	S	S	S
O/129 (10 µg)	S	/	S (20 µg)	S	/	S	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
ONPG glicocidasi	-	/	V	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
Arginina diidrossilasi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Listina Decarbossilasi	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ornitina decarbossilasi	-	+	+	+	+	+	V	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
Chitrato	V	+	+	+	+	+	V	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
Produzione di H2S	+	+	+	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
Riduzione nitrato	+	+	+	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
Ureasi	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
Tripotfano deamminasi	/	-	-	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
Indolo	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Test di Voges-Proskauer	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gelatinasi	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Metabolismo di:																			
Glucosio	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mannitolo	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Inositolo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sorbitolo	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ramnosio	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Saccarosio	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Melibiosio	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
Amygdalina	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
Arabinosio	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
Arbutine	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
Crescita in:																			
0% NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3% NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6% NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8% NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10% NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Emolisi in AS	/	/	β emolisi 3-4 giorni	/	/	α emolisi	/	/	/	β emolisi	/	/	/	/	/	/	/	/	/

APPENDICE B

Table with 29 columns: CPEPO, SPECIE, CODICE IZSA-VZ, TCBS, CROMAGAR broilare, CROMAGAR LUM, O129 (150 µg), O129 (10µg), Sclamante TSA 2%, EMOLISI, Mac Conkey, UREASI numero, ONPG, ADH, LDC, ODC, CIT, IBS, URE, TDA, IND, VP, GEL, GLU, MAN, INO, SOR, RHA, SAC, MEL, AMV, ARA, CODICE APZDE, and CRISCUITA 42C. It lists various bacterial strains and their characteristics.



## APPENDICE C

CEPPO	SPECIE BATTERICA	CODICE IZSVe	SEQUENZIAMENTO GENE PYRH	GENE TOXR	MALDITOF I Best Match	SCORE Best Match	MALDITOF II Best Match
1	<i>Vibrio harveyi</i>	144/ITT/06	<i>V. harveyi</i>	+	<i>V. harveyi</i>	2,377	<i>V. campbellii</i>
2	<i>Vibrio harveyi</i>	152/ITT/06.2	<i>V. harveyi</i>	+	<i>V. harveyi</i>	2,420	<i>V. campbellii</i>
3	<i>Vibrio harveyi</i>	194/ITT/06.2	<i>V. harveyi</i>	+	<i>V. harveyi</i>	2,490	<i>V. harveyi</i>
4	<i>Vibrio harveyi</i>	209/ITT/07.1	<i>V. harveyi</i>	+	<i>V. harveyi</i>	2,366	<i>V. harveyi</i>
5	<i>Vibrio harveyi</i>	180/ITT/08	<i>V. harveyi</i>	+	<i>V. harveyi</i>	2,337	<i>V. harveyi</i>
6	<i>Vibrio harveyi</i>	202/ITT/08.1	<i>V. harveyi</i>	+	<i>V. harveyi</i>	2,432	<i>V. harveyi</i>
7	<i>Vibrio harveyi</i>	212/ITT/09.2	/	+	<i>V. harveyi</i>	2,466	<i>V. campbellii</i>
8	<i>Vibrio harveyi</i>	5/ITT/10.1	/	+	<i>V. harveyi</i>	2,483	<i>V. harveyi</i>
9	<i>Vibrio harveyi</i>	30/ITT/14.1	<i>V. harveyi</i>	+	<i>V. harveyi</i>	2,297	<i>V. harveyi</i>
10	<i>Vibrio harveyi</i>	30/ITT/14.2	<i>V. harveyi</i>	+	<i>V. harveyi</i>	2,384	<i>V. harveyi</i>
11	<i>Vibrio harveyi</i>	30/ITT/14.3	<i>V. harveyi</i>	+	<i>V. harveyi</i>	2,408	<i>V. harveyi</i>
12	<i>Vibrio harveyi</i>	30/ITT/14.4	<i>V. harveyi</i>	+	<i>V. harveyi</i>	2,457	<i>V. harveyi</i>
13	<i>Vibrio harveyi</i>	30/ITT/14.5	<i>V. harveyi</i>	+	<i>V. harveyi</i>	2,353	<i>V. harveyi</i>
14	<i>Vibrio harveyi</i>	30/ITT/14.6	<i>V. harveyi</i>	+	<i>V. harveyi</i>	2,428	<i>V. harveyi</i>
15	<i>Vibrio harveyi</i>	30/ITT/14.7	<i>V. harveyi</i>	+	<i>V. harveyi</i>	2,250	<i>V. harveyi</i>
16	<i>Vibrio harveyi</i>	30/ITT/14.8	<i>V. harveyi</i>	+	<i>V. harveyi</i>	2,412	<i>V. harveyi</i>
17	<i>Vibrio harveyi</i>	30/ITT/14.9	<i>V. harveyi</i>	+	<i>V. harveyi</i>	2,454	<i>V. harveyi</i>
18	<i>Vibrio harveyi</i>	30/ITT/14.10	<i>V. harveyi</i>	+	<i>V. harveyi</i>	2,396	<i>V. owensii</i>
19	<i>Vibrio harveyi</i>	30/ITT/14.11	<i>V. harveyi</i>	+	<i>V. harveyi</i>	2,570	<i>V. harveyi</i>
20	<i>Vibrio harveyi</i>	30/ITT/14.12	<i>V. harveyi</i>	+	<i>V. harveyi</i>	2,325	<i>V. harveyi</i>
21	<i>Vibrio harveyi</i>	30/ITT/14.13	<i>V. harveyi</i>	+	<i>V. harveyi</i>	2,494	<i>V. harveyi</i>
22	<i>Vibrio harveyi</i>	30/ITT/14.14	<i>V. harveyi</i>	+	<i>V. harveyi</i>	2,364	<i>V. harveyi</i>
23	<i>Vibrio harveyi</i>	30/ITT/14.15	<i>V. harveyi</i>	+	<i>V. harveyi</i>	2,517	<i>V. owensii</i>
24	<i>Vibrio harveyi</i>	30/ITT/14.16	<i>V. harveyi</i>	+	<i>V. harveyi</i>	2,490	<i>V. harveyi</i>
25	<i>Vibrio harveyi</i>	30/ITT/14.17	<i>V. harveyi</i>	+	<i>V. harveyi</i>	2,369	<i>V. harveyi</i>
26	<i>Vibrio harveyi</i>	30/ITT/14.18	<i>V. harveyi</i>	+	<i>V. harveyi</i>	2,531	<i>V. harveyi</i>
27	<i>Vibrio harveyi</i>	30/ITT/14.19	<i>V. harveyi</i>	+	<i>V. harveyi</i>	2,488	<i>V. harveyi</i>
28	<i>Vibrio harveyi</i>	30/ITT/14.20	<i>V. harveyi</i>	+	<i>V. harveyi</i>	2,447	<i>V. harveyi</i>
29	<i>Vibrio harveyi</i>	179/ITT/14.2	<i>V. harveyi</i>	+	<i>V. harveyi</i>	2,290	<i>V. harveyi</i>
30	<i>Vibrio harveyi</i>	207/ITT/14.1	<i>V. harveyi</i>	+	<i>V. harveyi</i>	2,410	<i>V. harveyi</i>
31	<i>Vibrio harveyi</i>	207/ITT/14.2	<i>V. harveyi</i>	+	<i>V. harveyi</i>	2,430	<i>V. harveyi</i>
32	<i>Vibrio harveyi</i>	207/ITT/14.5	<i>V. harveyi</i>	+	<i>V. harveyi</i>	2,460	<i>V. harveyi</i>
33	<i>Vibrio harveyi</i>	247/ITT/14.1	<i>V. harveyi</i>	+	<i>V. harveyi</i>	2,430	<i>V. harveyi</i>
34	<i>Vibrio harveyi</i>	247/ITT/14.4	/	+	<i>V. harveyi</i>	2,568	<i>V. harveyi</i>
35	<i>Vibrio harveyi</i>	210/ITT/09.1	<i>V. harveyi</i>	+	<i>V. harveyi</i>	2,330	<i>V. harveyi</i>
36	<i>Vibrio harveyi</i>	208/ITT/12.1	<i>V. harveyi</i>	+	<i>V. harveyi</i>	2,460	<i>V. harveyi</i>
37	<i>Vibrio harveyi</i>	204/ITT/13.1	<i>V. harveyi</i>	+	<i>V. harveyi</i>	2,380	<i>V. harveyi</i>
38	<i>Vibrio harveyi</i>	317/ITT/13.1	<i>V. harveyi</i>	+	<i>V. harveyi</i>	2,250	<i>V. harveyi</i>
39	<i>Vibrio harveyi</i>	523/ITT/13.1	<i>V. harveyi</i>	+	<i>V. harveyi</i>	2,290	<i>V. harveyi</i>
40	<i>Vibrio harveyi</i>	625/ITT/13.3	<i>V. harveyi</i>	+	<i>V. harveyi</i>	2,330	<i>V. harveyi</i>
41	<i>Vibrio harveyi</i>	29/ITT/14.1	<i>V. harveyi</i>	+	<i>V. harveyi</i>	2,350	<i>V. harveyi</i>
42	<i>Vibrio harveyi</i>	10/ITT/15.1	<i>V. harveyi</i>	+	<i>V. harveyi</i>	2,460	<i>V. harveyi</i>
43	<i>Vibrio harveyi</i>	14/ITT/15.1	/	+	<i>V. harveyi</i>	2,310	<i>V. harveyi</i>
44	<i>Vibrio harveyi</i>	14/ITT/15.4	<i>V. harveyi</i>	+	<i>V. harveyi</i>	2,360	<i>V. harveyi</i>
45	<i>Vibrio harveyi</i>	55/ITT/15.1	/	+	<i>V. harveyi</i>	2,543	<i>V. harveyi</i>
46	<i>Vibrio harveyi</i>	55/ITT/15.2	/	+	<i>V. harveyi</i>	2,462	<i>V. harveyi</i>
47	<i>Vibrio harveyi</i>	55/ITT/15.3	/	+	<i>V. harveyi</i>	2,558	<i>V. harveyi</i>
48	<i>Vibrio harveyi</i>	55/ITT/15.4	<i>V. harveyi</i>	+	<i>V. harveyi</i>	2,465	<i>V. harveyi</i>
49	<i>Vibrio harveyi</i>	55/ITT/15.5	/	+	<i>V. harveyi</i>	2,402	<i>V. harveyi</i>
50	<i>Vibrio harveyi</i>	55/ITT/15.6	/	+	<i>V. harveyi</i>	2,430	<i>V. harveyi</i>
51	<i>Vibrio harveyi</i>	55/ITT/15.7	/	+	<i>V. harveyi</i>	2,419	<i>V. harveyi</i>
52	<i>Vibrio harveyi</i>	55/ITT/15.8	/	+	<i>V. harveyi</i>	2,456	<i>V. harveyi</i>
53	<i>Vibrio harveyi</i>	55/ITT/15.9	/	+	<i>V. harveyi</i>	2,465	<i>V. harveyi</i>
54	<i>Vibrio harveyi</i>	55/ITT/15.10	/	+	<i>V. harveyi</i>	2,548	<i>V. harveyi</i>
55	<i>Vibrio harveyi</i>	55/ITT/15.11	/	+	<i>V. harveyi</i>	2,435	<i>V. harveyi</i>
56	<i>Vibrio harveyi</i>	55/ITT/15.12	<i>V. harveyi</i>	+	<i>V. harveyi</i>	2,417	<i>V. harveyi</i>
57	<i>Vibrio harveyi</i>	55/ITT/15.13	/	+	<i>V. harveyi</i>	2,394	<i>V. harveyi</i>
58	<i>Vibrio harveyi</i>	55/ITT/15.14	/	+	<i>V. harveyi</i>	2,504	<i>V. harveyi</i>
59	<i>Vibrio harveyi</i>	55/ITT/15.15	<i>V. harveyi</i>	+	<i>V. harveyi</i>	2,497	<i>V. harveyi</i>
60	<i>Vibrio harveyi</i>	55/ITT/15.16	/	+	<i>V. harveyi</i>	2,424	<i>V. harveyi</i>
61	<i>Vibrio harveyi</i>	55/ITT/15.17	<i>V. harveyi</i>	+	<i>V. harveyi</i>	2,393	<i>V. harveyi</i>
62	<i>Vibrio harveyi</i>	110/ITT/15.1	/	+	<i>V. harveyi</i>	2,266	<i>V. parahaemolyticus</i>
63	<i>Vibrio harveyi</i>	110/ITT/15.2	/	+	<i>V. harveyi</i>	2,167	<i>V. parahaemolyticus</i>
64	<i>Vibrio harveyi</i>	110/ITT/15.3	/	+	<i>V. harveyi</i>	2,310	<i>V. parahaemolyticus</i>
65	<i>Vibrio harveyi</i>	231/ITT/15.1	<i>V. harveyi</i>	+	<i>V. harveyi</i>	2,347	<i>V. harveyi</i>
66	<i>Vibrio harveyi</i>	231/ITT/15.3	<i>V. harveyi</i>	/	<i>V. harveyi</i>	2,446	<i>V. harveyi</i>
67	<i>Vibrio harveyi</i>	26/ITT/16.11	<i>V. harveyi</i>	+	<i>V. harveyi</i>	2,498	<i>V. harveyi</i>
68	<i>Vibrio harveyi</i>	26/ITT/16.14	<i>V. harveyi</i>	+	<i>V. harveyi</i>	2,251	<i>V. harveyi</i>
69	<i>Vibrio harveyi</i>	59/ITT/16.3	<i>V. harveyi</i>	+	<i>V. harveyi</i>	2,310	<i>V. harveyi</i>
70	<i>Vibrio harveyi</i>	96/ITT/16.24	<i>V. harveyi</i>	+	<i>V. harveyi</i>	2,408	<i>V. harveyi</i>
71	<i>Vibrio harveyi</i>	106/ITT/16.19	<i>V. harveyi</i>	+	<i>V. harveyi</i>	2,359	<i>V. harveyi</i>
72	<i>Vibrio harveyi</i>	181/ITT/16.10	<i>V. harveyi</i>	+	<i>V. harveyi</i>	2,344	<i>V. harveyi</i>
73	<i>Vibrio harveyi</i>	300/ITT/16.1	/	/	<i>V. harveyi</i>	2,410	<i>V. harveyi</i>
74	<i>Vibrio harveyi</i>	300/ITT/16.2	<i>V. harveyi</i>	+	<i>V. harveyi</i>	2,425	<i>V. harveyi</i>
75	<i>Vibrio harveyi</i>	332/ITT/16.1	<i>V. harveyi</i>	+	-	-	-
76	<i>Vibrio harveyi</i>	10/ITT/17.1	/	+	<i>V. harveyi</i>	2,316	<i>V. campbellii</i>
77	<i>Vibrio harveyi</i>	200/ITT/17.4	/	+	<i>V. harveyi</i>	2,113	<i>V. harveyi</i>
78	<i>Vibrio harveyi</i>	220/ITT/17.2	<i>V. harveyi</i>	/	<i>V. harveyi</i>	2,267	<i>V. harveyi</i>
79	<i>Vibrio harveyi</i>	222/ITT/17.3	<i>V. harveyi</i>	+	<i>V. harveyi</i>	2,113	<i>V. harveyi</i>
80	<i>Vibrio harveyi</i>	421/ITT/17.1	/	+	<i>V. harveyi</i>	2,370	<i>V. harveyi</i>
81	<i>Vibrio harveyi</i>	136/ITT/15.20	<i>V. harveyi</i>	+	<i>V. harveyi</i>	2,092	<i>V. harveyi</i>
82	<i>Vibrio harveyi</i>	200/ITT/15.14	<i>V. harveyi</i>	+	<i>V. harveyi</i>	2,309	<i>V. harveyi</i>
83	<i>Vibrio harveyi</i>	200/ITT/15.15	<i>V. harveyi</i>	/	<i>V. harveyi</i>	2,480	<i>V. harveyi</i>
84	<i>Vibrio harveyi</i>	236/ITT/17.2	<i>V. harveyi</i>	+	<i>V. harveyi</i>	2,397	<i>V. harveyi</i>
85	<i>Vibrio harveyi</i>	326/ITT/17.2	/	+	<i>V. harveyi</i>	2,420	<i>V. campbellii</i>
86	<i>Vibrio harveyi</i>	33/ITT/18.16	/	+	<i>V. harveyi</i>	2,301	<i>V. harveyi</i>
87	<i>Vibrio harveyi</i>	33/ITT/18.21	/	+	<i>V. campbellii</i>	2,327	<i>V. harveyi</i> (2,299)
88	<i>Vibrio harveyi</i>	33/ITT/18.26	/	+	<i>V. harveyi</i>	2,301	<i>V. harveyi</i>
89	<i>Vibrio harveyi</i>	33/ITT/18.27	<i>V. harveyi</i>	+	<i>V. campbellii</i>	2,339	<i>V. harveyi</i> (2,287)

CEPPO	SPECIE BATTERICA	CODICE IZSVe	SEQUENZIAMENTO GENE PYRH	GENE TOXR	MALDITOF I Best Match	SCORE Best Match	MALDITOF II Best Match
90	<i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> ATCC 17911	R27	non amplificabile	-	/	/	/
91	<i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i> NCIMB 13351	R52	non amplificabile	-	/	/	/
92	<i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i> NCIMB 2182	R53	non amplificabile	-	/	/	/
93	<i>Vibrio alginolyticus</i> LMG 4409	R26	<i>V. alginolyticus</i>	-	<i>V. alginolyticus</i>	2,484	<i>V. diabolicus</i>
94	<i>Vibrio anguillarum</i> O1 LMG 10861	R13	/	-	<i>V. anguillarum</i>	2,370	<i>V. anguillarum</i>
95	<i>Vibrio anguillarum</i> O2 LMG 10862	R14	<i>V. anguillarum</i>	-	<i>V. anguillarum</i>	2,300	<i>V. anguillarum</i>
96	<i>Vibrio anguillarum</i> O6 LMG 10866	R18	<i>V. anguillarum</i>	-	<i>V. anguillarum</i>	2,340	<i>V. anguillarum</i>
97	<i>Vibrio campbellii</i> CECT 523	R64	<i>V. campbellii</i>	-	<i>V. campbellii</i>	2,456	<i>V. owensii</i>
98	<i>Vibrio cholerae</i> ATCC 25872	R152	<i>V. cholerae</i>	-	<i>V. cholerae</i>	2,393	<i>V. cholerae</i>
99	<i>Vibrio diabolicus</i> LMG 23867	R8	/	-	<i>V. diabolicus</i>	2,261	<i>V. alginolyticus</i>
100	<i>Vibrio gigantis</i> DSMZ 18531	R183	<i>V. gigantis</i>	bande differenti	<i>V. gigantis</i>	2,341	/
101	<i>Vibrio harveyi</i> CECT 4215	R189	<i>V. harveyi</i>	+	<i>V. harveyi</i>	2,421	<i>V. harveyi</i>
102	<i>Vibrio harveyi</i> LMG 4044	R24	<i>V. harveyi</i>	+	<i>V. harveyi</i>	2,274	<i>V. harveyi</i>
103	<i>Vibrio metschnikovii</i> CECT 5070	R190	non amplificabile	-	/	/	/
104	<i>Vibrio mytili</i> CECT 632	R187	<i>V. mytili</i>	-	<i>V. mytili</i>	2,410	<i>V. mytili</i>
105	<i>Vibrio natriegens</i> CECT 526	R185	<i>V. natriegens</i>	-	<i>V. natriegens</i>	2,400	<i>V. diabolicus</i>
106	<i>Vibrio neptunius</i> DSMZ 17183	R180	/	-	<i>V. neptunius</i>	2,313	/
107	<i>Vibrio ordalii</i> CECT 582	R186	/	-	<i>V. ordalii</i>	2,693	<i>V. anguillarum</i> O4
108	<i>Vibrio orientalis</i> CECT629	R155	<i>V. neptunius</i>	-	<i>V. orientalis</i>	2,345	/
109	<i>Vibrio owensii</i> LMG 25443	R9	<i>V. owensii</i>	bande differenti	<i>V. owensii</i>	2,450	<i>V. campbellii</i>
110	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> ATCC 17802	R43	<i>V. parahaemolyticus</i>	-	<i>V. parahaemolyticus</i>	2,560	<i>V. parahaemolyticus</i>
111	<i>Vibrio rotiferianus</i> LMG 21460	R11	<i>V. rotiferianus</i>	bande differenti	<i>V. rotiferianus</i>	2,558	<i>V. campbellii</i>
112	<i>Vibrio scophthalmi</i> DSMZ 19140	R177	<i>V. scophthalmi</i>	-	<i>V. scophthalmi</i>	2,272	/
113	<i>Vibrio vulnificus</i> ATCC 27562	R45	<i>V. orientalis</i>	-	<i>V. vulnificus</i>	2,405	/
114	<i>Vibrio xuii</i> DSMZ 17185	R181	<i>V. xuii</i>	-	/	/	/
115	<i>Vibrio alginolyticus</i>	145/ITT/15.3	<i>V. alginolyticus</i>	-	<i>V. alginolyticus</i>	2,360	/
116	<i>Vibrio alginolyticus</i>	200/ITT/15.18	<i>V. alginolyticus</i>	-	<i>V. alginolyticus</i>	2,404	/
117	<i>Vibrio orientalis</i>	202/ITT/15.5	<i>Vibrio orientalis/V. atypicus</i>	-	<i>V. orientalis</i>	1,762	/
118	<i>Vibrio rotiferianus</i>	326/ITT/17.6	/	-	<i>V. rotiferianus</i>	2,401	<i>V. campbellii</i>
119	<i>Vibrio rotiferianus</i>	211/ITT/15.2	<i>V. rotiferianus</i>	-	<i>V. rotiferianus</i>	2,430	<i>V. campbellii</i>
120	<i>Vibrio rotiferianus</i>	228/ITT/15.3	<i>Vibrio rotiferianus</i>	-	<i>V. rotiferianus</i>	2,518	<i>V. campbellii</i>
121	<i>Vibrio rotiferianus</i>	200/ITT/15.19	<i>V. rotiferianus</i>	-	<i>V. rotiferianus</i>	2,378	<i>V. campbellii</i>
122	<i>Vibrio vulnificus</i>	14 ITT 15.3	<i>V. vulnificus</i>	-	<i>V. vulnificus</i>	2,370	/

# Abstract

## Vibriosis caused by *V. harveyi*:

### studies on pathogenesis and vaccine efficacy in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*)

*Vibrio harveyi* is a Gram negative bacterium of the family Vibrionaceae that is considered an emerging pathogen for global marine aquaculture. It has been reported with increasing frequency in finfish species reared in subtropical regions (groupers, barramundi, flatfish, pompano), in sharks and in gasteropods (abalone), and it is a well known problem in the husbandry of post-larvae stages of penaeid shrimps. In Europe and particularly in the Mediterranean basin this microorganism is gaining importance in the farming of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and flatfish (*Solea* spp.).

In *D. labrax*, *V. harveyi* has been isolated during mortality outbreaks characterized by lethargy, ataxia, cutaneous and enteric lesions occurred mainly during the grow-out phase (40-160 g) and in juveniles housed in hatcheries. Unlike the well known *Vibrio anguillarum* pathogen, studies on the etiopathogenesis of *V. harveyi* in European sea bass and the characterization of strains isolated from this species are still scarce. Moreover, since this is an emerging disease, the development of an effective vaccine against the vibriosis by *V. harveyi* is of great interest for national and Mediterranean aquaculture, both in the initial stages in hatchery (vaccination by immersion) and in the following grow-out (intraperitoneal immunization).

The objectives of the study were 1) the standardization of an identification protocol for *V. harveyi* using a polyphasic approach (phenotypic and genetic analysis and protein profiling) and 2) the evaluation of the pathogenicity of *V. harveyi* isolates in sea bass, developing at the same time an experimental vaccination protocol.

### Standardization of an identification protocol for *V. harveyi*

The discriminating capacity of the biochemical, molecular and proteomic methods was evaluated by comparing a collection of 81 isolates of *V. harveyi* (isolated in finfish and shellfish species) with reference strains of *V. harveyi*, and other 22 species of the family Vibrionaceae. These species are associated either with the *Harveyi* clade (*V. owensii*, *V. campbellii*, *V. alginolyticus*, *V. natriegens*, *V. rotiferianus*, *V. parahaemolyticus*, *V. mytili*) or with other pathogens of sea bass.

The collection of *V. harveyi* strains was built up with 51 isolates collected by the Department of Veterinary Medical Sciences of the University of Bologna and the Centro Specialistico Ittico (IZSVE) between 2008 and 2014. Subsequently between 2014 and 2017, 38 other strains were isolated from European sea bass and sea bream from different breeding conditions (sea cages, raceway), from ornamental species (genera *Pterois*, *Caesio*, *Lutjanus*, *Chromis*, *Pseudoanthias*, *Apolemichthys*), from water samples taken from public aquaria and from bivalve molluscs.

The phenotypic evaluation was based on biochemical tests in macromethod and micrometod (API20E) and growth on differential and selective media, highlighting as discriminating tests those associated with aminoacid metabolism such as: arginine dehydrolase (ADH -), lysine decarboxylase (LDC +), ornithine decarboxylase (ODC +) and metabolism of citrate (CIT +) and sucrose (SAC +) associated with pigmentation on CHROMagar™ Vibrio at 48 h.

Comparing the results obtained with the data collected from the literature, phenotypic differences were detected between strains isolated from different hosts (fish, molluscs and crustaceans). In particular, the growth of colonies in TCBS has shown that isolates from fish are almost exclusively saccharolytic, unlike those isolated from crustaceans and molluscs; while the characteristic luminescence of pathogenic strains of penaeid shrimps appears to be relatively rare in strains isolated from finfish and shellfish.

Bio-molecular analysis was carried out using two different approaches: i) sequencing and phylogenetic analysis of the housekeeping gene uridine monophosphate kinase (*pyrH*), in order to confirm the identification of the isolates at the species level through the comparison with the sequences available in the literature; ii) amplification of the *toxR* gene in its hypervariable region by *V. harveyi* species-specific primers. The second protocol has been perfected, increasing its specificity comparing to the published method (Pang et al., 2006) and has allowed the direct identification of all the *V. harveyi* isolates of the collection. The identification *via* protein profile was determined by means of Mass Spectrometry (MALDI-TOF) by analyzing the ribosomal protein content of each isolate and comparing the spectra obtained with the Bruker Daltonics database, previously implemented with standardized reference strains (93 strains) of the Vibrionaceae family. For all the strains analyzed, the outcome of the MALDI-TOF reflected the species assignment obtained from the molecular examination (*pyrH* gene), confirming this method as quick and efficient in identifying species within the *Harveyi* clade.

The antibiotic sensitivity/resistance profile was also evaluated on 49 *V. harveyi* strains, isolated from clinical episodes or environmental samples, comparing the results obtained by disk diffusion test (Kirby-Bauer method) with the Minimal Inhibitory Concentration (MIC) identified by broth microdilution.

### **Pathogenicity evaluation of *V. harveyi* isolates in European sea bass and development of an experimental vaccination protocol**

10 *V. harveyi* strains with variable biochemical characteristics, isolated in different Mediterranean farms, were tested by intraperitoneal inoculation (IP) and immersion in sea-bass to evaluate the *in vivo* virulence of each strain and to gather clinical signs and the anatomic and histopathological findings associated with *V. harveyi* infection. Signs such as apathy, melanosis, hyperventilation associated in some cases with neurological signs (ataxia and spiral swimming), preceded by a few hours death,

generally with asphyxiated facies (dilated opercula). Mortality was observed for 8 strains starting from 12-16 hours post-infection and ending in 72-96 hours. The necropsy showed severe enteritis with marked dilatation of the intestinal lumen (proximal tract) and severe encephalic congestion. In the specimens infected by immersion, only one strain highlighted significant mortality preceded by cutaneous lesions with desquamation, dermal ulcers with exposure of the musculature and keratitis.

Four highly pathogenic strains were then selected and for each one, the Lethal Dose (LD<sub>70</sub>) was experimentally determined for IP inoculation. At the same time, starting from 3 of these strains, a polyvalent whole cell vaccine was produced, obtained by inactivating bacterial cells with formaldehyde, to be administered by immersion or by inoculation. The bacterin produced for IP inoculum was enriched with thermally inactivated extracellular extracts (ECP) and emulsified or not with adjuvant Montanide™ 763 AVG (Seppic).

After performing safety tests to assess the tolerability of the IP preparation (with or without adjuvant), a complete vaccination protocol in sea bass of 10 ± 2 g was conducted. The vaccination was followed by a potency test. The infection was performed with three strains of *V. harveyi* (two highly pathogenic strains included into the vaccine preparation and a strain with moderate pathogenicity not included in the vaccine), in order to evaluate the possible cross-protection of the vaccine. The immunization protocol *via* immersion was administered through a 15-minute exposure to the vaccine preparation (1×10<sup>9</sup> cfu/ml), repeated after 30 days. Immunization was followed after 7 weeks by infection (challenge) by immersion or by IP, according to the previously infectious doses calculated for each strain. The relative percentage survival (RPS) of vaccinated fish was 43.0% in the immersion trial (mortality of the controls was 93%) and variable between 23-66% in the groups infected with the 3 strains by IP. IP vaccinations were performed by inoculum of 0,1 ml of vaccine (5×10<sup>10</sup> cfu/ml), with or without adjuvant followed by a potency challenge via IP 4 weeks after vaccination for the groups immunized with vaccine without adjuvant and after 12 weeks for the remaining groups. The RPS obtained were variable (IP with adjuvant: 44-100%; IP without adjuvant: 60-82%,) but were not always statistically significant due to a reduced mortality in the control groups (17-37%). A further potency test was carried out with IP vaccine without adjuvant in sea bass of 30 ± 5 g, evaluated after 4 weeks by IP infection with the 3 *V. harveyi* strains (3×10<sup>7</sup> cfu/specimen), obtaining a high mortality in the control groups (74-92%). RPS was found to be variable among the different strains: the only heterologous strain with moderate pathogenicity showed a RPS 43%, while the two homologous strains with higher pathogenicity presented a lower RPS (10-34%).

An indirect ELISA test was subsequently developed to compare the immune response (serum IgM) of the specimens vaccinated with different methods after safety and potency tests. The ELISA highlighted a significantly greater response in specimens injected IP with adjuvant vaccine.



## Conclusions

The analyses performed showed excellent agreement in the identification of *V. harveyi* through different diagnostic methods applied on a large number of field strains. The phenotypic analysis highlighted which biochemical tests in macromethod are more discriminating for *V. harveyi*. The amplification of the *toxR* gene with species-specific primers appears promising for its quickness and cost-efficiency compared to the sequencing of the *pyrH* gene. The identification by MALDI-TOF appears to be even more cost-efficient, faster and reliable thanks to the preliminary implementation of the Bruker Daltonics database with reference strains of the *Vibrio* genus.

The infection trials with *V. harveyi* in European sea bass showed strains with different virulence and allowed to describe the clinical signs and lesions caused by this microorganism.

The polyvalent vaccine tested would appear to exhibit a non-optimal RPS, either administered by immersion or used for intraperitoneal inoculation (non-adjuvant). Serological analysis conducted using ELISA detected a significant antibody response only in the specimens inoculated with adjuvant vaccine, although further evidence of vaccine efficacy will need to be investigated in order to evaluate the protection induced *in vivo* by IP administration of the adjuvant vaccine.