

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA



Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute

Scuola di specializzazione in Allevamento, igiene, patologia delle
specie acquatiche e controllo dei prodotti derivati

Direttore della Scuola: Prof. Francesco Quaglio

TESI DI SPECIALIZZAZIONE

Valutazione della sicurezza ed efficacia di vaccini a DNA
contro il virus della setticemia emorragica virale (VHS) e
della necrosi ematopoietica infettiva (IHN)
somministrati per via intramuscolare in trota iridea
(*Oncorhynchus mykiss*)

Relatore:

Dott.ssa Anna Toffan

Medico in formazione specialistica:

Dott. Andrea Marsella

Matricola n°1178490

Anno Accademico: 2019/2020

Sommario

RIASSUNTO	1
ABSTRACT	3
INTRODUZIONE	5
LA TROTA IRIDEA.....	5
PRINCIPALI MALATTIE VIRALI DELLA TROTA: VIRUS DELLA SETTICEMIA EMORRAGICA VIRALE (SEV) E DELLA NECROSI EMATOPOIETICA INFETTIVA (NEI)	8
VACCINI A DNA	19
SCOPO DELLA TESI.....	27
MATERIALI E METODI.....	29
ANIMALI	29
ALLESTIMENTO E CONTROLLO DEI VACCINI SPERIMENTALI.....	31
VIRUS DI CHALLENGE	37
DISEGNO SPERIMENTALE	37
RISULTATI.....	43
DISCUSSIONI	51
CONCLUSIONI.....	55
BIBLIOGRAFIA	57

Riassunto

La Setticemia Emorragica Virale (VHS) e la Necrosi Ematopoietica Infettiva (IHN) sono due malattie virali soggette ad obbligo di notifica ai sensi del D.Lgs 148/2008 che danneggiano fortemente la produzione di trota iridea a livello nazionale. Nonostante gli sforzi profusi per eradicarle, le due malattie continuano ad essere endemiche sul territorio nazionale, con la eccezione di pochi compartimenti dichiarati indenni. Sebbene sia autorizzata la vaccinazione nelle zone infette o nell'ambito di un piano di eradicazione, al momento attuale non esistono presidi vaccinali autorizzati per l'immissione al commercio in Europa e per l'utilizzo in trota iridea nei confronti delle due malattie. La disponibilità di simili prodotti rappresenta un punto cruciale nella sostenibilità della trota coltura. Il presente progetto ha valutato la sicurezza e l'efficacia in trota iridea di vaccini a DNA progettati contro VHS e IHN attraverso prove sperimentali condotte presso l'Acquario Sperimentale dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie. Per la prova di Safety, i due vaccini sono stati inoculati per via intramuscolo in giovanili di trota iridea al doppio della dose massima prevista dal disegno sperimentale (1 µg/pesce) per valutare l'assenza di effetti collaterali negli animali trattati. Dopo 14 gg dalla somministrazione, gli animali sono stati soppressi e porzioni di muscolo campionate per le analisi istologiche. Per la valutazione dell'efficacia, gruppi di giovanili di trota iridea sono stati vaccinati intramuscolo con due diverse dosi dei due vaccini (0,1 µg/pesce e 1 µg/pesce), sia in singolo che in combinazione. Dopo 60 giorni i pesci sono stati infettati per bagno con ceppi di selezionati di VHS e IHN, in singolo e in combinazione, e monitorati per 30 giorni per valutare l'efficacia della protezione. Prima del challenge e a timepoints prestabiliti, cinque soggetti scelti casualmente sono stati campionati da tutti i gruppi sperimentali per prelevare sangue, muscolo, milza, intestino e rene da sottoporre ad analisi di laboratorio e così valutare l'eventuale comparsa di alterazioni tissutali legate ai vaccini, la persistenza degli stessi negli animali trattati e per indagare le peculiarità della risposta immunitaria indotta. La somministrazione dei vaccini non ha comportato la comparsa di segni di sofferenza o mortalità negli animali trattati. A livello istologico, nel punto di inoculo è stata osservata frammentazione delle fibre muscolari fino a 48h dalla somministrazione, accompagnata da un moderato infiltrato infiammatorio mononucleato. Nei campionamenti successivi, si è riscontrata l'assenza di lesioni morfologiche a carico delle fibre muscolari con persistenza dell'infiltrato infiammatorio nei gruppi trattati alla dose più

alta. La protezione più efficace è stata riscontrata nei gruppi vaccinati in singolo alla dose di 1 µg/pesce con una percentuale relativa di sopravvivenza (RPS) pari a 78,93% nel caso del vaccino per VHS e a 73,14% per quello diretto verso IHN. Nel caso della combinazione dei due presidi la RPS è risultata pari al 48,76%. I vaccini a DNA utilizzati nel presente studio sono risultati sicuri per gli animali ed efficaci nel ridurre le mortalità indotte dai virus della VHS e IHN. Le analisi previste sui campioni prelevati saranno fondamentali per meglio caratterizzare alcuni aspetti del funzionamento e della persistenza tissutale dei vaccini a DNA. I risultati ottenuti nel presente studio permetteranno di strutturare una prova in condizioni di campo dei vaccini utilizzati alla dose di 1 µg/pesce e valutare l'applicabilità e la protezione conferita nella realtà della trotticoltura nazionale.

Abstract

Italian rainbow trout farming industry is strongly affected by Viral Hemorrhagic Septicemia (VHS) and Infectious Hematopoietic Necrosis (IHN), two diseases caused by viruses belonging to the genus *Novirhabdovirus*. Both are regulated according to the EU Directive 2006/88 and the notification of outbreaks is mandatory. Despite eradication efforts, both VHS and IHN are endemic in Italy except for few compartments declared free. Vaccination is allowed in those territories declared infected and as part of an eradication program. Currently commercially licensed products are missing. The availability of vaccines is considered a key point in controlling and reducing impact of VHS and IHN on rainbow trout production.

Evaluating the safety and efficacy of DNA vaccine against VHS and IHN was the aim of this study. To reach this objective two experimental trials were conducted at the IZSVe Experimental Aquarium. A Safety Test was set up, inoculating rainbow trout juveniles with the double of the maximum dose scheduled by the experimental plan (1 µg/fish) and monitoring the onset of pain or mortality events. After 14 days, fish were euthanized and muscle samples were collected from the site of inoculation for histological analysis. For the Potency Test, rainbow trout juveniles were vaccinated with two dosages of VHS and IHN vaccine (0,1 µg/fish and 1 µg/fish), singularly and in combination. 60 days after the vaccination, fish were bath challenged with selected strains of VHS and IHN and monitored for 30 days. Five randomly selected fish were collected from each experimental group at scheduled timepoints. Muscle, kidney, spleen, intestine and blood were sampled for evaluating tissue damage eventually caused by vaccine, plasmid persistence in inoculated fish and immune response induced.

DNA vaccine didn't cause any sign of pain or mortality both in the Safety and in the Potency Test. Histologically, in the injection site, muscular fibers showed fragmentation until 48h after vaccination. A moderate mononuclear inflammatory infiltrate was present as well. In the following muscle samples no morphological lesions were noticed and the inflammatory infiltrate was still present until 30 days post vaccination in the groups treated with the higher dose. Vaccines at the dose of 1 µg/fish induced the highest protection, reaching a RPS of 78,93% against VHS and 73,14% against IHN. Combination of the two plasmids resulted in a RPS of 48,76%. DNA vaccines resulted to be safe and efficient in reducing the impact of VHS and IHN infection in rainbow trout. Analysis of collected samples will be necessary for better characterize the DNA vaccine working mechanism and their persistence in the treated

fish. Results obtained in the current study will allow to design a field trial in order to evaluate the efficacy of DNA vaccines administered intramuscularly at the dose of 1 $\mu\text{g}/\text{fish}$ in reducing VHS and IHN impact on rainbow trout farms.

Introduzione

La trota iridea

Ordine : Salmoniformes

Famiglia: Salmonidae

Sottofamiglia: Salmoninae

Genere: *Oncorhynchus*

Specie: *mykiss*



<https://www.marcadoc.com/trota-iridea-del-sile/>

La trota iridea è originaria dei corsi d'acqua che sfociano nel Pacifico del Nord in una regione che spazia dall'Asia, in un'area delimitata dalla Penisola del Kamchatka e dall'estuario del fiume Amur, fino al Nord America, in una zona compresa tra l'Alaska e il nord del Messico (Figura 1). La distribuzione di questa specie ittica si è ampliata a partire dalla seconda metà dell'Ottocento a seguito dell'introduzione in America del Sud, Asia del Sud, Oceania ed Australia, diventando cosmopolita (Pennel & Barton, 1996). In Europa, la prima introduzione risale al 1882 in Germania (Kottelat & Freyhof, 2007), seguita da altre introduzioni in Danimarca (1890), Svezia (1892) e Norvegia (1894) (Weidema, I.R., 2000). In Italia la prima introduzione viene fatta risalire al 1885 in Trentino. Al giorno d'oggi la specie è presente lungo tutto la penisola, grazie a massicce opere di semine di giovanili provenienti da allevamenti (Pastorino & Prearo, 2016). Le uniche popolazioni selvatiche che si sono acclimatate si riscontrano nell'arco alpino di Austria, Svizzera e Slovenia, e nel fiume Serchio in Toscana (Kottelat & Freyhof, 2007). Si ritiene che le trote iridee introdotte nei vari paesi europei provengano dallo stesso areale, ossia dal fiume McCloud in California nei pressi dell'immissione nel fiume Sacramento (Kottelat & Freyhof, 2007).

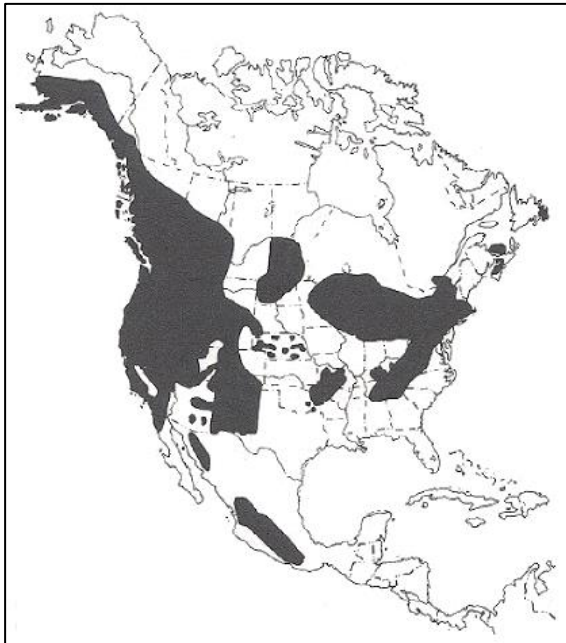


Figura 1: Distribuzione dulciacquicola nel Nord America di *Oncorhynchus mykiss*. Fonte: <https://www.nrcs.usda.gov/>

La trota iridea presenta una suddivisione in popolazioni complessa, basata su differenze morfologiche, comportamentali e genetiche originate dalla separazione fisica in nicchie ecologiche diverse per morfologia e condizioni ambientali. La suddivisione più importante riconosce popolazioni anadrome, caratterizzate da importanti migrazioni a scopo riproduttivo dal mare verso corpi idrici dulciacquicoli, e popolazioni stanziali che compiono tutto il ciclo vitale in acqua dolce. Nell'areale di origine, gli esemplari stanziali presentano un'aspettativa di vita compresa tra 3 e 5 anni, con il raggiungimento della maturità sessuale mediamente dopo 3 anni per le femmine e dopo 2-3 anni per i maschi (Pennel & Barton, 1996). La taglia e il peso medi dipendono dall'ambiente in cui si trovano gli animali e si aggirano intorno al metro di lunghezza per 3-4 chili di peso. Diversamente, la popolazione anadroma presenta un'aspettativa di vita più lunga, circa 4-8 anni, e possono raggiungere la taglia di 7-10 kg a 3 anni di età (FAO) e viene chiamata *steelhead trout* per differenziarla dalla stanziale *rainbow trout*.

La trota iridea si ritrova in ambienti acquatici lotici e lentici, purché caratterizzati da acqua di elevata qualità ed ossigenazione, con temperature non superiori ai 20°C. L'alimentazione si compone principalmente di invertebrati, in particolare stadi larvali ed adulti di chironomidi e altri insetti, gasteropodi, crostacei e in minor misura pesci (Forneris et al,1990; Bruslé & Imbert, 2002). La riproduzione avviene in autunno e primavera, al raggiungimento della temperatura ottimale compresa tra 10 e 13°C. Le femmine depongono le uova in nidi scavati

nel fondo del corso idrico ed esse vengono fecondate dai maschi. Ogni esemplare depone in media 2000 uova per chilogrammo di peso vivo. Queste misurano tra 3 e 5 millimetri di diametro e hanno un colore dal rosato all'arancio, dipendente dalla concentrazione di carotenoidi. Le cure parentali cessano al momento della schiusa delle uova, la quale avviene dopo circa 300-350 gradi/giorno. Gli avannotti si radunano in zone del letto del fiume caratterizzate da debole corrente e vicino alle sponde. Il sostentamento è basato sul consumo delle risorse metaboliche contenute nel sacco vitellino fino al completo assorbimento dello stesso, che avviene dopo circa 120 gradi/giorno (Jokumsen & Svendsen, 2010). In questo stadio, i giovanili si avvicinano alla superficie per insufflare la vescica natatoria e avviano i comportamenti di predazione. La trota iridea è oggetto di allevamento per produzione di alimento, rifornimento delle strutture di pesca sportiva e a scopo di ripopolamento dei corsi d'acqua. Dopo il salmone atlantico, è il secondo salmonide più allevato globalmente, con una produzione annua nel 2018 che si è aggirata intorno alle 848.050 tonnellate (FishStatJ), e la terza specie maggiormente allevata a livello europeo con una produzione nel 2018 di 288.108 tonnellate (FishStatJ). L'Italia occupa una posizione di rilievo nel panorama europeo in questo settore (Tabella 1 e Tabella 2).

Tabella 1: Primi 10 paesi produttori nel 2018 in acquacoltura di trota iridea in Europa continentale. I valori sono espressi in tonnellate. Dati FAO FishStatJ.

Paese	2018
Turchia	112.427
Norvegia	68.215
Russia	35.204
Italia	32.825
Danimarca	29.737
Francia	26.100
Polonia	15.945
Finlandia	13.180
Regno Unito	13.100
Spagna	10.438

Nel 2019 sono state prodotte 37.000 tonnellate (Dati API) di trota, per la maggior parte iridea, per un corrispettivo valore economico pari a circa 120.250.000 di euro.

Tabella 2: Prodotti e produzioni della trotticoltura italiana nel 2019. Dati API.

Prodotto	Volume in tonnellate	Valore in migliaia di euro
Trota	37.000	120.250
Uova embrionate trota iridea	220	2.640
Caviale di trota	53	ND
Uova destinate al consumo	13	ND

Principali malattie virali della trota: Virus della Setticiemia Emorragica Virale (SEV) e della Necrosi Ematopoietica Infettiva (NEI)

Caratteri comuni

Il virus della Setticiemia Emorragica Virale (SEV), o Viral Hemorrhagic Septicemia, e il virus della Necrosi Ematopoietica Infettiva (NEI), o Infectious Hematopoietic Necrosis, appartengono all'ordine *Mononegavirales*, famiglia *Rhabdoviridae*, genere *Novirhabdovirus*. Il materiale genomico è costituito da un singolo filamento di RNA a polarità negativa delle dimensioni di circa 11-12 kbp, contenuto in un capsido a forma di proiettile, a simmetria elicoidale, delle dimensioni di circa 70 x 180 nm (VHS) e 70 x 110 nm (IHN), ed avvolto da envelope (OIE, 2019; Kibenge F.S.B. & Godoy M., 2016). Il filamento di RNA codifica 6 proteine, di cui 4 strutturali: una nucleoproteina (N), una fosfoproteina associata alla polimerasi (P), una proteina di matrice (M), una glicoproteina di superficie (G), una proteina non strutturale (NV) e la RNA polimerasi RNA dipendente (L) (Dixon, Paley, Alegria-Moran, & Oidtmann, 2016; Kim & Faisal, 2011). Le particelle virali presentano un ribonucleocapside, composto dalla proteina N, dalle proteine L e P e dal materiale genomico, il quale è collegato alla glicoproteina G tramite la proteina M. La membrana esterna è formata da uno strato lipidico e dalle proiezioni superficiali della glicoproteina G, che rappresenta il principale antigene di superficie, responsabile dell'adesione virale alle cellule target e della formazione di anticorpi neutralizzanti (Kibenge F.S.B. & Godoy M., 2016; Woo & Bruno, 2006) La proteina NV invece viene codificata solo nel momento di attiva replicazione virale e svolge importanti funzioni di regolazione del processo di replicazione stesso e della interazione con la cellula ospite, funzioni che sono ancora dibattute (Thoulouze, Bouguyon, Carpentier, & Bre, 2004).

VHS

La prima descrizione di una malattia riferibile a VHS risale al 1938 in un allevamento di trota iridea in Danimarca (Schäperclaus, 1938). L'eziologia virale, sospettata in base alle lesioni anatomopatologiche nel 1962 nel corso del primo focolaio di VHS in Italia, venne dimostrata solo successivamente nel 1963 quando il virus venne isolato in coltura su una linea cellulare derivante da gonadi di trota iridea (RTG-2) (Jensen, 1965). Inizialmente il VHS era considerato confinato nell'Europa continentale, ma nel 1989 arrivarono le prime segnalazioni dall'America del Nord (Hopper et al, 1989; Brunson et al, 1989). Ad oggi, l'infezione da VHS è stata descritta in tutta la zona temperata dell'emisfero boreale. La specie più suscettibile al VHS risulta essere la trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*) ma il virus è stato isolato da più di 80 specie ittiche. Le specie per cui esistono evidenze di suscettibilità al VHS sono riportate nel Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals (OIE,2019) (Tabella 3).

Tabella 3: Specie per cui esistono evidenze scientifiche di suscettibilità al VHS. Modificato da OIE,2019.

Order	Family	Common name	Latin name
Salmoniformes	Salmonidae	Trota iridea	<i>Oncorhynchus mykiss</i>
		Salmone reale	<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>
		Salmone argentato	<i>Oncorhynchus kisutch</i>
		Salmone atlantico	<i>Salmo salar</i>
		Trota fario	<i>Salmo trutta</i>
		Timallo	<i>Thymallus thymallus</i>
		Coregone/Lavarello	<i>Coregonus lavaretus</i>
		Coregone	<i>Coregonus spp.</i>
			<i>O. mykiss</i> × <i>O. kisutch</i>
			<i>O. mykiss</i> × <i>S. fontinalis</i> <i>triploid</i>
	<i>O. mykiss</i> × <i>S. alpinus</i> <i>triploid</i>		
Esociformes	Esocidae	Muskellunge	<i>Esox masquinongy</i>
		Luccio	<i>Esox lucius</i>
Clupeiformes	Clupeidae	Aringa	<i>Clupea harengus</i>
		Aringa oceanica	<i>Clupea pallasii</i>
		Sardina oceanica	<i>Sardinops sagax</i>
		Spratto/Papalina	<i>Sprattus sprattus</i>
Gadiformes	Gadidae	Merluzzo nordico	<i>Gadus morhua</i>

		Cappellano/Busbana	<i>Trisopterus minutus</i>	
		Merlano/Molo	<i>Merlangius merlangus</i>	
		Melù/Potassolo	<i>Micromesistius poutassou</i>	
		Merluzzetto norvegese	<i>Trisopterus esmarkii</i>	
		Merluzzo d'Alaska	<i>Theragra chalcogramma</i>	
	Lotidae		<i>Enchelyopus cimbrius</i>	
		Bottatrice	<i>Lota lota</i>	
Merlucciidae		Nasello del Pacifico	<i>Merluccius productus</i>	
Pleuronectiformes	Pleuronectidae	Limanda	<i>Limanda limanda</i>	
		Passera di mare	<i>Platichthys flesus</i>	
		Platessa	<i>Pleuronectes platessa</i>	
		Halibut	<i>Reinhardtius hippoglossoides</i>	
		Halibut	<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	
	Scophthalmidae		Rombo chiodato	<i>Scophthalmus maximus</i>
Paralichthyidae		Ippoglosso giapponese	<i>Paralichthys olivaceus</i>	
Osmeriformes	Argentinidae		Argentina	<i>Argentina sphyraena</i>
	Osmeridae			<i>Hypomesus pretiosus</i>
Perciformes	Ammodytidae			<i>Ammodytes hexapterus</i>
				<i>Ammodytes spp.</i>
				<i>Ammodytes personatus</i>
	Gobiidae		Ghiozzetto minuto	<i>Pomatoschistus minutus</i>
				<i>Neogobius melanostomus</i>
	Embiotocidae			<i>Cymatogaster aggregata</i>
	Sciaenidae			<i>Aplodinotus grunniens</i>
	Scombridae		Lanzardo/Sgombro occhione	<i>Scomber japonicus</i>
Percidae			<i>Perca flavescens</i>	
Moronidae		Spigola/Branzino	<i>Dicentrarchus labrax</i>	
Gasterosteiformes	Gasterosteidae		Spinarello	<i>Gasterosteus aculeatus</i>
Cypriniformes	Cyprinidae			<i>Pimephales promelas</i>
Petromyzontiformes	Petromyzontidae		Lampreda di fiume	<i>Lampetra fluviatilis</i>

Sulla base delle sequenze dei geni G, N e NV, sono stati identificati 4 genotipi:

- Genotipo I: suddiviso in 5 sottotipi, comprende tutti gli isolati in acqua dolce. Il sottotipo Ia comprende tutti gli isolati europei, mentre il sottotipo Ib comprende isolati marini.
- Genotipo II: comprende isolati dal Mar Baltico
- Genotipo III: ad esso appartengono isolati dal Mare del Nord e dall'Oceano Atlantico Settentrionale.
- Genotipo IV: suddiviso in due sottotipi a cui appartengono gli isolati americani, giapponesi e coreani.

Utilizzando anticorpi monoclonali e policlonali, sono stati identificati 3 sierogruppi (Olesen, Lorenzen, & Jørgensen, 1993), i quali tuttavia non presentano correlazione con i genotipi (OIE, 2019). Gli isolati appartenenti al genotipo Ia, gli unici di interesse in Europa continentale, corrispondono ad un unico sierogruppo. La replicazione virale avviene principalmente a livello delle cellule endoteliali, con particolare interessamento di milza e rene cefalico che rappresentano i principali organi emopoietici (Woo & Bruno, 2006), da cui emerge il quadro prevalentemente emorragico della malattia, e presenta un optimum di temperatura compreso tra 9 e 12°C. La forma clinica della malattia può presentarsi da temperature minime di 2°C fino ad un massimo di circa 15°C (OIE, 2019; Woo & Bruno, 2006). La trasmissione avviene per via orizzontale, mentre la trasmissione verticale non è stata ancora dimostrata, anche se è molto comune la trasmissione perinatale derivante dalla contaminazione delle uova con i fluidi riproduttivi ricchi di virus. L'infezione avviene sia per contatto diretto tra gli animali che attraverso acqua infetta. Poiché molti animali, una volta superata la forma acuta della malattia, rimangono persistentemente infetti, i sopravvissuti generalmente agiscono come serbatoi virali ed eliminatori virali per lungo tempo. Il ruolo degli uccelli ittiofagi nella diffusione del VHS è ancora incerto: la trasmissione attraverso le feci appare improbabile a causa della degradazione virale a livello gastrico. Più plausibili appaiono la possibilità di rigurgito di pesce infetto e il trasporto del virus sulla superficie corporea dei volatili (Kim & Faisal, 2011). Inoltre a livello zootecnico, un ruolo preponderante nella trasmissione del VHS è ricoperto dai veicoli utilizzati nel trasporto di mangimi e/o animali.

Gli stadi più sensibili all'infezione da VHS sono i giovanili, nei quali la malattia può indurre mortalità del 100%, mentre nei soggetti adulti la mortalità oscilla tra 25 e 75% (Kim & Faisal,

2011). Sono descritte tre forme di malattia: una forma iperacuta in cui gli animali giungono a morte in assenza di segni premonitori e una forma acuta i cui segni clinici più frequenti sono rappresentati da letargia, anoressia, melanosi cutanea, esoftalmo mono o bilaterale e distensione celomatica (Figura 2). Gli animali colpiti si raggruppano generalmente presso le griglie terminali delle vasche di stabulazione. Inoltre è descritta una forma cronica caratterizzata dall'insorgenza di sintomi nervosi rappresentati da nuoto circolare e a scatti. All'esame anatomopatologico esterno, i pesci presentano emorragie cutanee puntiformi diffuse, ifema mono o bilaterale e anemia branchiale. Internamente si possono presentare sia quadri di congestione viscerale diffusa che di anemia generalizzata. Si apprezzano emorragie petecchiali a livello di fegato, grasso periviscerale, muscolatura, vescica natatoria e ascite (Figura 3) (Woo & Bruno, 2006).



Figura 2: Giovani di trota iridea nei pressi della griglia a fondo vasca. I soggetti colpiti manifestano melanosi, esoftalmo mono o bilaterale e letargia.



Figura 3: Lesioni anatomopatologiche tipiche di infezione da Novirhabdovirus. Da notare le emorragie a livello muscolare e sulla sierosa della vescica natatoria, il pallore di branchie e fegato e la marcata splenomegalia.

IHN

La prima descrizione della malattia causata da IHN risale al 1953 in salmone rosso (*Oncorhynchus nerka*) allevato in America del Nord (Rucker et al, 1953), mentre il virus responsabile della malattia venne isolato ed identificato nel 1969 (Wingfield et al, 1969). Successivamente, tramite le movimentazioni di uova ed avannotti infetti, il virus è stato introdotto in Asia (Sano et al, 1977) e in Europa (Baudin-Laurencin, 1987; Bovo et al, 1987). Inizialmente, si riteneva che il virus infettasse unicamente il genere *Oncorhynchus*, ma in seguito vennero descritti focolai in altri salmonidi selvatici appartenenti ai generi *Salmo*, *Salvelinus* e *Thymallus*. Le specie ritenute sensibili dall'OIE sono riportate nella Tabella 4.

Tabella 4: Specie ritenute suscettibili all'infezione da IHN. Modificato da OIE,2019.

Ordine	Famiglia	Nome comune	Nome latino
Salmoniformes	Salmonidae		<i>Oncorhynchus clarki</i>
		Salmone keta	<i>Oncorhynchus keta</i>
		Salmone argentato	<i>Oncorhynchus kisutch</i>
		Salmone giapponese	<i>Oncorhynchus masou</i>
		Trota iridea	<i>Oncorhynchus mykiss</i>
		Salmone rosso	<i>Oncorhynchus nerka</i>
		Salmone reale	<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>
		Salmone atlantico	<i>Salmo salar</i>
		Trota marmorata	<i>Salmo marmoratus</i>
		Trota fario	<i>Salmo trutta</i>
		Salmerino alpino	<i>Salvelinus alpinus</i>
		Salmerino di fonte	<i>Salvelinus fontinalis</i>
	<i>Salvelinus namaycush</i>		
Esociformes	Esocidae	Luccio	<i>Esox lucius</i>

Le analisi filogenetiche hanno evidenziato l'esistenza di 3 genogruppi, denominati U,M e L, acronimi di Upper, Middle e Lower, in relazione alla localizzazione geografica di isolamento nel Nord America (Kurath et al., 2003). Gli isolati europei derivano dal genogruppo M (Enzmann et al., 2010), ma sono evoluti oramai in un gruppo genetico chiaramente distinto da esso e chiamato E. Infine esiste un ulteriore genotipo, chiamato J e diffuso in Giappone, originato dall'importazione di animali infetti da IHN genotipo U ed evoluto separatamente (Cieslak et al., 2017).

Il virus presenta un tropismo per i tessuti emopoietici e cellule endoteliali e pertanto gli organi più coinvolti nella patogenesi della IHN sono il rene cefalico e la milza. La temperatura idonea per la replicazione virale è compresa tra 8 e 14°C, ma prove sperimentali hanno evidenziato come il virus sia in grado di indurre malattia a temperatura comprese tra 3 e 18 °C (OIE, 2019).

La trasmissione avviene per via orizzontale. Sebbene una vera trasmissione verticale sia da escludersi a fronte di alcuni studi (Amend, 1975; Yoshimizu et al, 1989), l'utilizzo di uova infette è stato reputato l'unica fonte di infezione in focolai insorti in zone geografiche IHN free (Winton, 1991). Inoltre è dimostrato che i protocolli di disinfezione delle uova non siano sempre efficaci nel prevenire l'insorgenza della malattia (Robert, 1993). Pertanto si ipotizza che la superficie delle uova venga contaminata dal contatto con liquidi gonadici infetti e

rappresenti un fattore di rischio al momento della schiusa. Gli stadi più sensibili all'infezione sono i giovanili, in particolare fino a 2 mesi di età (Lapatra, 1998). La patogenesi della malattia e la forma clinica della stessa è sovrapponibile alla VHS e pertanto la discriminazione tra le due malattie deve avvenire tramite diagnosi laboratoristica. La mortalità può insorgere in assenza di segni clinici premonitori. I pesci colpiti possono manifestare letargia, nuoto anomalo, melanosi, esoftalmo, petecchie emorragiche sulla superficie cutanea e distensione celomatica (Woo & Bruno, 2006). Anche l'IHN presenta una forma cronica caratterizzata dall'insorgenza di sintomi nervosi. In questo caso, gli animali colpiti possono presentare contrazioni tetaniche che sembrano essere all'origine delle deformità scheletriche (Figura 4) riportate in soggetti sopravvissuti all'infezione da IHN (Kibenge and Godoy, 2016).



Figura 4: Trota iridea sopravvissuta all'infezione da IHN con manifesta deformazione scheletrica

All'esame anatomopatologico si può evidenziare anemia branchiale e degli organi celomatici (Figura 5) associata ad un quadro emorragico, con presenza di petecchie a livello di fegato, grasso periviscerale, cuore e della sierosa della vescica natatoria.



Figura 5: Quadro anatomopatologico compatibile con IHN. Oltre alle petecchie emorragiche localizzate a livello muscolare e alla splenomegalia, è possibile notare un'anemia diffusa

Normativa e situazione epidemiologica in Italia

A livello europeo la VHS e l'IHN sono malattie normate ai sensi della Direttiva 2006/88 CE relativa alle condizioni di polizia sanitaria applicabili alle specie animali d'acquacoltura e ai relativi prodotti, nonché alla prevenzione di talune malattie degli animali acquatici e alle misure di lotta contro tali malattie e successive modifiche. In Italia tale Direttiva è stata recepita dal Decreto Legislativo 148/2008 e sue successive modifiche. Entrambe le malattie figurano nell'elenco delle malattie per cui è obbligatoria la notifica. In base al loro stato sanitario in relazione alle malattie elencate nell'Allegato IV parte B del D.Lgs 148/2008, le aziende vengono classificate in una delle seguenti categorie:

- Categoria I: indenne da malattia
- Categoria II: programma di sorveglianza in atto
- Categoria III: stato sanitario indeterminato
- Categoria IV: con programma di eradicazione in corso
- Categoria V: ufficialmente infetto

Lo stato sanitario delle aziende di acquacoltura viene determinato da ispezioni da parte delle Autorità Competenti e determina le possibilità commerciali delle aziende secondo il seguente schema:

Categoria	Stato sanitario	Può introdurre animali da	Certificazione sanitaria		Può inviare animali a
			Introduzione	Invio	
I	Indenne da malattia	Solo categoria I	Si	No se inviati a cat III e V Si se inviati a cat II e IV	Tutte le cat
II	Programma di sorveglianza	Solo categoria I	Si	No	Categoria III e V
III	Indeterminato	Categoria I,II o III	No	No	Categoria III e V
IV	Programma di eradicazione	Solo categoria I	Si	Si	Solo categoria V
V	Infetto	Tutte le categorie	No	Si	Solo categoria V

A partire dal 21 aprile 2021, con l'entrata in vigore del Regolamento UE 2016/429 del Parlamento Europeo e del consiglio del 9 marzo 2016, VHS e IHN saranno classificate come malattie di categoria C+D+E e cioè malattie rilevanti per alcuni Stati membri e rispetto alle quali sono necessarie misure per evitarne la diffusione in parti dell'Unione che ne sono ufficialmente indenni o che hanno programmi di eradicazione per la malattia interessata.

Entrambe le malattie sono endemiche in Italia, nonostante gli sforzi messi in campo da alcune regioni per l'eradicazione delle stesse. Nel 2019 in Italia per lo status relativo a VHS sono risultati classificati in Categoria I 195 impianti, 7 in Categoria II, 345 in Categoria III e 16 risultano infetti, mentre per IHN 190 rientrano in Categoria I, 7 in Categoria II, 326 in Categoria III e 14 sono infetti (Dati IZSve, Centro di Referenza Nazionale per le malattie dei pesci, molluschi e crostacei). Nell'anno 2019 in Italia si sono verificati un solo nuovo focolaio di VHS e uno di IHN sul territorio nazionale.



Figura 6: Distribuzione degli impianti indenni da VHS in Italia

La Decisione di Esecuzione UE 2015/1554 della Commissione dell'11 settembre 2015 specifica i dettagli relativi alla frequenza e consistenza dei campionamenti necessari per l'ottenimento dello status di indennità da malattia e del piano di sorveglianza. Tali campionamenti devono avvenire nel periodo dell'anno in cui la temperatura dell'acqua è inferiore a 14°C e devono consistere di almeno 10 soggetti se sintomatici o 30 se non si evidenziano segni clinici riferibili a VHS/IHN. Per i riproduttori è previsto il campionamento di fluido ovarico o liquido seminale. La diagnosi di laboratorio viene effettuata tramite isolamento su colture cellulari o tramite Real Time RT-PCR. Qualora le analisi risultassero positive, l'azienda interessata deve essere dichiarata ufficialmente infetta. Gli animali con manifesti segni di malattia devono essere rimossi ed eliminati sotto controllo dell'Autorità Competente, la quale vigila affinché la malattia in questione non si diffonda ad altri compartimenti. Gli animali clinicamente sani possono essere destinati al consumo umano se hanno raggiunto la taglia commerciale. In base alla valutazione del rischio e del tempo previsto, è possibile ritardare lo svuotamento dell'impianto per consentire il raggiungimento della taglia minima commercializzabile. Effettuato lo svuotamento, l'impianto viene sottoposto a deterzione e disinfezione, prima di osservare un periodo di vuoto sanitario della durata di 6 settimane. Il ripopolamento deve essere effettuato con animali provenienti da

un'azienda classificata come Categoria I. In alternativa allo svuotamento dell'intera azienda prima di effettuare il ripopolamento, nella Nota Ministeriale 2386 del 31/01/2017, si contempla la possibilità di procedere ad un'eradicazione a fasi, sotto controllo dell'Autorità Competente e supportata da una serie di controlli diagnostici a carico del proprietario. Qualora la zona o il compartimento non intendano riottenere lo status sanitario precedente, essi vengono dichiarati infetti e l'Autorità Competente dispone l'istituzione di una zona di protezione, la limitazione delle movimentazioni e vigila affinché i soggetti morti vengano smaltiti in conformità alle normative vigenti. Tuttavia, non è obbligatorio procedere all'eradicazione della malattia e l'azienda può continuare la propria attività con le limitazioni alle movimentazioni proprie della Categoria V. La vaccinazione è proibita nelle zone o compartimenti dichiarati indenni da malattia, mentre può essere autorizzata in tali zone e compartimenti dichiarati infetti, o qualora rientri in un piano di eradicazione. Al momento attuale non esiste in Europa e nel mondo un presidio vaccinale per VHS e IHN autorizzato per la trota iridea all'immissione al commercio.

Vaccini a DNA

I vaccini a DNA sono elementi che si compongono di un vettore plasmidico e di una sequenza nucleotidica codificante per una proteina di interesse antigenico (glicoproteina G nel caso dei *Novirhabdovirus*), la cui espressione è responsabile della stimolazione della risposta immunitaria e quindi della protezione. La struttura generale (Figura 7) comprende una sequenza promoter e una enhancer per avviare la trascrizione del vettore, la sequenza di interesse, una sequenza poliadenilata per la terminazione del prodotto di trascrizione, un gene di antibiotico resistenza per permettere la selezione delle colonie nella fase di clonazione e una sequenza di avvio replicazione batterica.

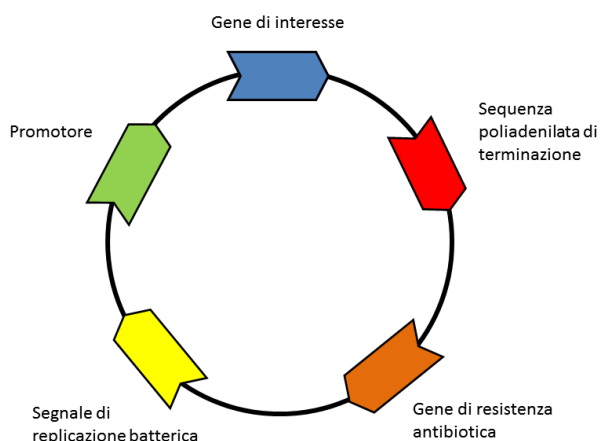


Figura 7: Struttura generale di un vaccino a DNA

Il procedimento di produzione consiste nella progettazione del plasmide, clonazione in colonie di *E. coli* e selezione dei cloni presentanti il plasmide attraverso una selezione mediata dall'utilizzo di un antibiotico, amplificazione delle colonie selezionate in fermentatori e purificazione del plasmide. Quest'ultimo può essere mantenuto in soluzione oppure liofilizzato e conservato a lungo a causa della stabilità intrinseca del materiale (Gudding et al., 2014). In confronto ad altre tipologie di presidi vaccinali, i vaccini a DNA risultano pertanto più economici e di facile produzione su larga scala.

I meccanismi di azione di seguito descritti sono relativi agli studi effettuati nei confronti dei *Novirhabdovirus*, nei quali tali presidi vaccinali hanno mostrato l'induzione di una buona protezione. A seguito dell'inoculo e del successivo ingresso nella cellula, i plasmidi penetrano nel nucleo e il promotore avvia la trascrizione del gene di interesse. Il risultante mRNA viene tradotto a livello citosolico con la produzione della proteina antigenica, la quale assume la sua forma tridimensionale, viene glicosilata e complessata tramite legami non covalenti in trimeri, prima di raggiungere nella sua forma matura la superficie cellulare. Una volta esposta, la proteina tal quale può legarsi a Toll-like Receptor (TLR), o altri Pattern Recognition Receptors, presenti sulle cellule circostanti e attivare una risposta interferonica di tipo I, oppure ad anticorpi circolanti. In alternativa, alcune molecole possono essere ridotte a peptidi da parte di proteasomi e complessate a livello di sistema reticolo-endoteliale a molecole di MHC tipo I e indurre l'attivazione di cellule T citotossiche. Alcune molecole proteiche possono essere rilasciate nello spazio extracellulare tramite secrezione o degradazione delle cellule transfettate. In questo caso, tali molecole vengono fagocitate da cellule presentanti

l'antigene, processate, complessate al MHC tipo II ed esposte sulla superficie cellulare, avviando così una risposta immunitaria umorale mediata da cellule T-helper (Collins et al., 2019). Questa attività è svolta principalmente da cellule dendritiche e cellule macrofagiche. Tuttavia alcuni studi suggeriscono che in uno stato di attivazione, quale quello indotto dall'inoculazione del plasmide vaccinale, anche i miociti possano svolgere attività di presentazione antigene (Shirota et al., 2007) ed esprimere molecole MHC sia di tipo I (Pooley et al., 2013) che tipo II (Keller et al., 2011). Ne risulta pertanto che i vaccini a DNA sono in grado di stimolare sia un'immunità di tipo umorale che cellulo-mediata. Inoltre l'attività immunogenica dei plasmidi non è legata solo alla trascrizione della proteina di interesse. Infatti alcuni elementi strutturali, quali motivi CpG non metilati, mRNA o il plasmide stesso, possono indurre l'attivazione anche dell'immunità innata (Collins et al., 2019; Tonheim, Bøggwald, & Dalmo, 2008)

La protezione indotta dal plasmide può essere suddivisa in tre fasi:

- Prima Fase: una protezione non specifica si instaura precocemente dopo la vaccinazione ed è dovuta all'attivazione di meccanismi di immunità innata.
- Seconda Fase: meccanismi di immunità cellulo-mediata e umorale, tra cui la produzione di anticorpi neutralizzanti, sono responsabili dell'insorgere di un'immunità antivirale specifica.
- Terza Fase: persistenza della protezione che nel caso di IHN può durare per circa 2 anni (Kurath et al., 2006). I meccanismi alla base della protezione non sono ancora chiariti. In questa fase non sono presenti anticorpi neutralizzanti.

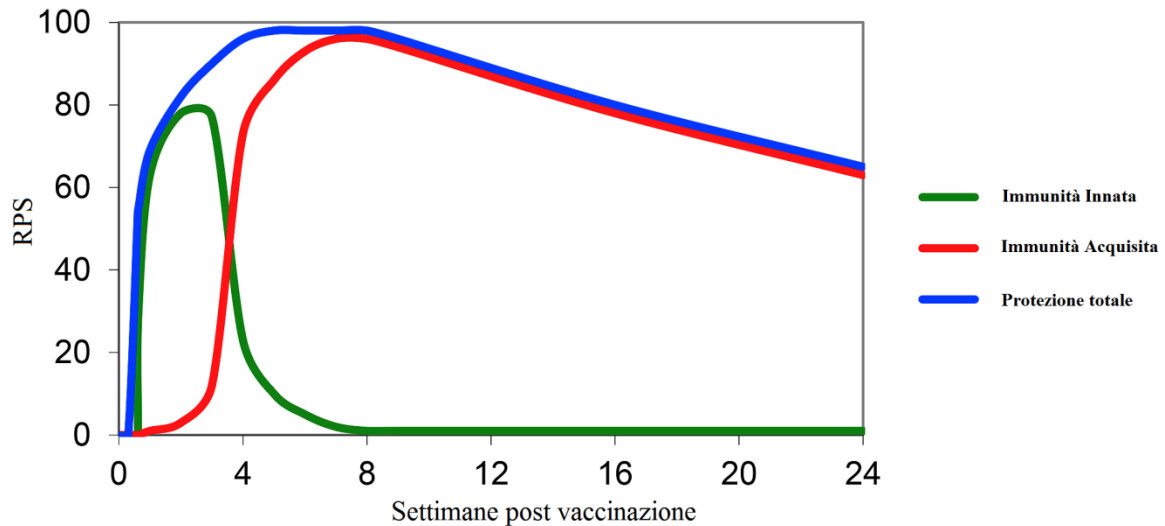


Figura 8: Attivazione dei meccanismi di immunità innata ed acquisita. I tempi indicati sono relativi e risultanti da prove effettuate a 12-15°C. Modificato da Collins et al., 2019.

La principale via di somministrazione dei vaccini a DNA è intramuscolare, che risulta la più efficace a motivo dei meccanismi di azione sopradescritti. Sono stati condotti studi sulla somministrazione orale, che rappresenta una via più facilmente applicabile in condizioni di campo, con risultati variabili (Reyes et al., 2017; Valero et al., 2016).

In confronto ad altre tipologie di vaccini, i vaccini a DNA presentano numerosi vantaggi (Tonheim et al., 2008):

- Attivazione dell'immunità innata ed acquisita.
- Protezione duratura
- Basso volume di inoculo
- Un singolo plasmide può contenere più sequenze di interesse e quindi indurre protezione nei confronti di più malattie in una unica somministrazione
- L'assenza di adiuvanti previene l'insorgenza degli effetti collaterali ad essi collegati, come ad esempio la formazione di granulomi nei filetti.
- Assenza di tossicità sistemica per l'animale vaccinato.
- Produzione facile, poco costosa e facilmente standardizzabile.

I potenziali rischi individuati nell'utilizzo dei vaccini a DNA in animali ad indirizzo zootecnico sono i seguenti (Collins et al., 2019):

- Effetti avversi sull'ospite vaccinato, quali integrazione nel genoma, disturbo dei processi metabolici ed immunitari.

- Effetti avversi sul consumatore dovuti alla presenza del plasmide e di sequenze strutturali quali la regione promoter derivata da *Cytomegalovirus* (CMV) o la regione codificante per la resistenza ad un antibiotico (kanamicina), necessaria per i processi produttivi del plasmide. Tali elementi possono rappresentare un rischio in caso di integrazione genomica o assimilazione da parte della microflora intestinale.
- Effetti negativi sull'ambiente limitrofo all'area di utilizzo del plasmide e di allevamento degli animali vaccinati.

Proprio a causa del rischio di integrazione, i vaccini a DNA sono stati spesso contrastati e trattati con diffidenza, ma la probabilità di integrazione dei plasmidi nel genoma dell'ospite, presupposto che essi non siano progettati perché ciò avvenga, è da considerarsi inferiore all'insorgenza di una mutazione spontanea (Simard, 2008). Per quanto concerne i potenziali effetti sugli animali vaccinati, i vaccini a DNA non hanno mostrato effetti avversi nell'utilizzo in medicina umana e nei pochi studi effettuati sui pesci (Kurath et al., 2006). Per il consumatore i rischi sono considerati trascurabili: il plasmide non viene assunto direttamente e viene degradato nell'ospite vaccinato (90 minuti in topo e 45 giorni in trota iridea) (Tonheim et al., 2008). Il normale ciclo produttivo della trota iridea dura generalmente 15 mesi, in dipendenza di numerosi fattori quali alimentazione, temperatura media dell'acqua, impatto di patologie, caratteristiche genetiche degli animali allevati. La quantità di plasmide residua a fine ciclo nel filetto risulterà quindi infinitesimale o nulla.

Il rischio principale individuato riguarda i possibili effetti negativi sull'ambiente limitrofo all'area in cui avvengono le procedure di vaccinazione ed utilizzo dei plasmidi. L'iniezione intramuscolo è una tecnica efficace nel somministrare i presidi vaccinali ma presenta come aspetto negativo la possibile fuoriuscita di soluzione dal punto di iniezione a causa della ridotta estensione ed elasticità del sottocute dei pesci, la struttura del tessuto muscolare e l'elevata pressione idrostatica che si raggiunge al momento dell'inoculazione. Inoltre è possibile l'eliminazione del plasmide integro da parte dell'animale vaccinato attraverso le deiezioni, anche se questo non è mai stato dimostrato.

Il pericolo insito nella dispersione dei plasmidi vaccinali nell'ambiente è correlato agli elementi strutturali che lo compongono. In particolare, la presenza di una regione codificante per la resistenza alla kanamicina, necessaria per la produzione dei plasmidi, rappresenta un fattore contribuente allo sviluppo di antibiotico-resistenza da parte di batteri ambientali.

Tuttavia, una volta raggiunto l'ambiente esterno, a motivo delle caratteristiche fisiche, chimiche e biologiche ambientali, il presidio vaccinale subisce una rapida degradazione. Inoltre, i plasmidi sono progettati in modo da ridurre le specie batteriche in grado di assimilarlo e ridurre l'uptake da parte dei microrganismi ambientali (Glenting & Wessels, 2005).

La limitazione principale all'utilizzo dei vaccini a DNA e alla loro commercializzazione è legata alla loro stessa natura, e quindi alla loro eventuale classificazione e di quella dei soggetti cui vengono somministrati come OGM. Facendo riferimento al protocollo di Cartagena sulla prevenzione dei rischi biotecnologici relativo alla Convenzione sulla Diversità Biologica, ratificato in Italia con la legge n°27 del 15 gennaio 2004, I vaccini a DNA non rientrano nella definizione di OGM così come gli organismi a cui vengono somministrati, a motivo della loro incapacità di replicarsi autonomamente e della bassissima probabilità che avvenga integrazione nel genoma dell'ospite.

Per quanto concerne gli animali trattati, la Direttiva europea 2001/18 del 12 marzo 2001 sull'emissione deliberata nell'ambiente di organismi geneticamente modificati stabilisce che si intende per modifica genetica di un organismo l'utilizzo di una delle seguenti tecniche riportate all'Allegato Ia, ossia:

- 1) tecniche di ricombinazione dell'acido nucleico che comportano la formazione di nuove combinazioni di materiale genetico mediante inserimento in un virus, un plasmide batterico o qualsiasi altro vettore, di molecole di acido nucleico prodotte con qualsiasi mezzo all'esterno di un organismo, nonché la loro incorporazione in un organismo ospite nel quale non compaiono per natura, ma nel quale possono replicarsi in maniera continua;
- 2) tecniche che comportano l'introduzione diretta in un organismo di materiale ereditabile preparato al suo esterno, tra cui la microiniezione, la macroiniezione e il microincapsulamento;
- 3) fusione cellulare (inclusa la fusione di protoplasti) o tecniche di ibridazione per la costruzione di cellule vive, che presentano nuove combinazioni di materiale genetico ereditabile, mediante la fusione di due o più cellule, utilizzando metodi non naturali

Secondo la normativa, facendo riferimento in particolare al punto 1), i vaccini a DNA rappresenterebbero una tecnica riconosciuta come modificazione genetica. Tuttavia, essi non

sono progettati né per replicarsi in maniera continua né per integrarsi nel genoma dell'ospite, la cui evenienza spontanea è già stata discussa. Pertanto, anche gli animali vaccinati non possono essere classificati come OGM.

Nonostante le difficoltà collegate alla percezione da parte del consumatore dei vaccini a DNA, numerosi presidi sono stati sviluppati per l'uso in medicina veterinaria nei confronti di diverse malattie come infezione da West Nile virus, virus della rabbia, FIV, FeLV, BVD, BRSV, PRRS e influenza aviaria (Redding & Weiner, 2009). Globalmente, al giorno d'oggi sono autorizzati all'immissione in commercio e disponibili sul mercato quattro vaccini a DNA, riportati in Tabella 5:

Tabella 5: Vaccini a DNA autorizzati all'immissione in commercio nel mondo.

Prodotto	Malattia target	Specie animale
West-Nile Innovator® DNA (Fort Dodge)	West Nile Disease	Cavallo
Oncept (Merial)	Melanoma canino	Cane
Apex-IHN (Novartis, UK),	IHN	Salmone atlantico
Clynav (Elanco)	Pancreas Disease	Salmone atlantico

Per l'uso in acquacoltura, Apex-IHN è stato autorizzato nel 2005 in Canada per la protezione da IHN con ottimi risultati. Nel 2017 Clynav è stato autorizzato per l'immissione al commercio in Europa e rappresenta una pietra miliare per lo sviluppo ed autorizzazione di altri vaccini a DNA. È altresì importante sottolineare che al momento attuale non esistono presidi vaccinali di questo tipo autorizzati all'uso in trota iridea.

Scopo della Tesi

L'Italia è il primo produttore di trote iridee in Comunità Europea ed è particolarmente danneggiata dalla presenza di due malattie virali, VHS e IHN, che insistono nel territorio da più di trent'anni. Il controllo di VHS e IHN al momento è basato esclusivamente sullo svuotamento e sanificazione degli impianti infetti, e sul successivo ripopolamento con animali provenienti da impianti indenni, pratica che peraltro non garantisce la protezione nei confronti di una possibile reinfezione nelle aziende il cui stato sanitario può dipendere da quello dell'ambiente circostante. Infatti, nei territori dove tali virus sono endemici e le aziende utilizzano acqua di fiume, le malattie sono difficilmente controllabili. Questa condizione è aggravata dal fatto che in Italia non sono autorizzati né sono disponibili vaccini contro queste due patologie, costituendo uno dei punti critici per la sostenibilità della troteicoltura nazionale. A differenza dei vaccini tradizionali basati su virus inattivati, che hanno dimostrato scarsa protezione nei confronti di VHS e IHN, i vaccini a DNA stimolano nei pesci una risposta immunitaria specifica, efficace e prolungata contro tali malattie. Oltre che efficaci, i vaccini a DNA sono considerati relativamente economici da produrre, stabili, e sicuri per la specie target e per il consumatore finale. Lo scopo dello studio è stato pertanto quello di investigare la sicurezza e l'efficacia di vaccini a DNA progettati nei confronti di VHS e IHN e somministrati per via intramuscolo in trota iridea.

Il presente studio è stato svolto nell'ambito del Progetto di Ricerca Corrente IZSVE 09/18 RC approvato dal Ministero della Salute.

Materiali e Metodi

Animali

Giovanili di trota iridea del peso di 0,9 grammi provenienti da un'avannotteria indenne per VHS e IHN sono stati introdotti nell' Acquario sperimentale di IZSVe, autorizzato per la sperimentazione animale con documento numero 194/2011-A del 05/10/2011 e numero 78/2012-A del 13/03/2012, mantenuti in quarantena e acclimatati per almeno 10 giorni come previsto dalle norme interne e nazionali in ambito di benessere degli animali sperimentali. Gli animali sono stati stabulati in vasche troncoconiche in vetroresina con capacità di 300 litri, attrezzate a circuito aperto e con coperchio. La temperatura dell'acqua è stata mantenuta a 12°C e l'ossigeno disciolto superiore a 6 ppm tramite pietre porose. L'alimento è stato somministrato manualmente tramite tecnica dello spaglio e a più riprese in modo da garantire un'equa distribuzione del cibo a tutti gli animali presenti in vasca e ridurre così la competizione alimentare. La quantità somministrata giornalmente variava tra 1 e 1,5 % della biomassa, come da indicazioni del produttore del mangime per il mantenimento. Inoltre in questo modo è stato possibile monitorare gli animali ed evidenziare precocemente eventuali sintomi di sofferenza. Al raggiungimento della taglia prevista dal disegno sperimentale di circa 10 grammi, gli animali sono stati divisi nei seguenti gruppi:

- Vasca 5: trote vaccinate contro VHS con doppia dose rispetto a quella massima (2 µg/pesce) per il controllo della sicurezza
- Vasca 6: trote vaccinate contro IHN con doppia dose rispetto a quella massima (2 µg/pesce) per il controllo della sicurezza
- Vasca 7: trote non vaccinate e non infettate (controllo negativo)
- Vasca 8: trote non vaccinate e infettate con VHS e IHN (controllo positivo)
- Vasca 9: trote non vaccinate e infettate con VHS (controllo positivo)
- Vasca 10: trote non vaccinate e infettate con IHN (controllo positivo)
- Vasca 11 e 12: trote vaccinate contro VHS a due diverse dosi (0,1 e 1 µg/pesce)
- Vasca 13 e 14: trote vaccinate contro IHN a due diverse dosi (0,1 e 1 µg/pesce)
- Vasca 15 e 16: trote vaccinate contro VHS e IHN a due diverse dosi (0,1 e 1 µg/pesce)

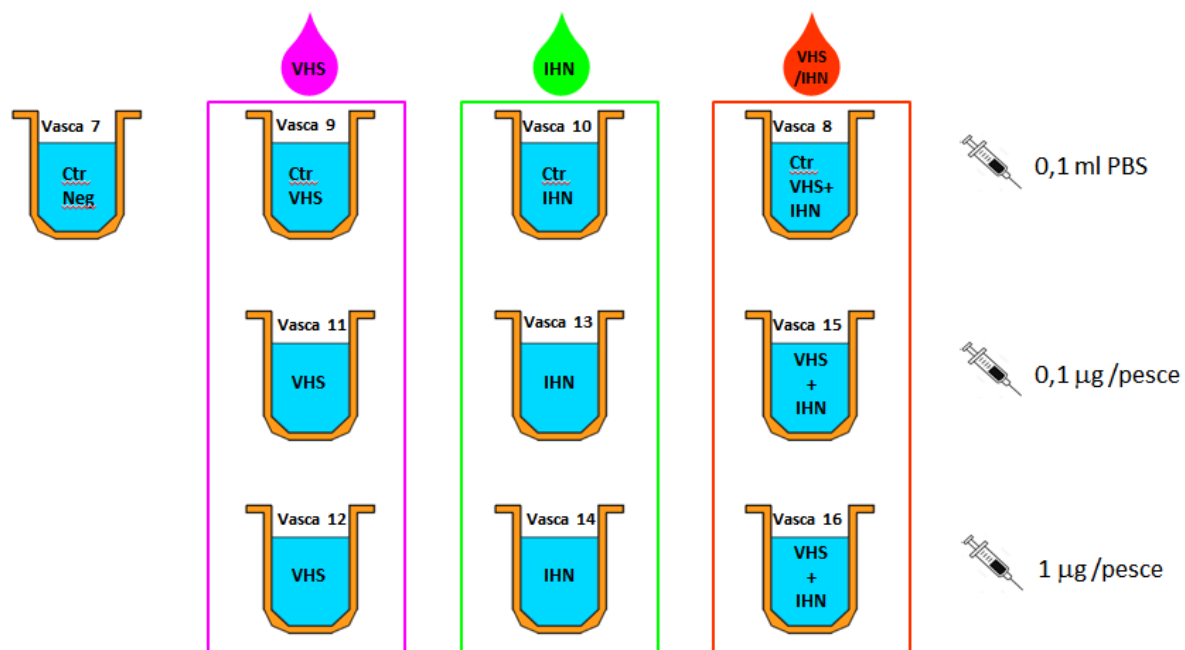


Figura 9: Schematizzazione dei diversi gruppi sperimentali previsti dal Potency Test.

Per ciascun gruppo, la numerosità campionaria è stata stabilita pari a 34 animali per i gruppi del Safety test, ritenendo la somministrazione del vaccino dannosa nel momento in cui la mortalità risultasse uguale a 30% e assumendo un errore di primo tipo α pari al 0,05 e una potenza del test uguale a 0,80. Per quanto riguarda il Potency test, supponendo che la mortalità cumulativa del gruppo di controllo non vaccinato infettato fosse almeno del 60%, per ottenere una Percentuale di Sopravvivenza Relativa (RPS) $>75\%$ la mortalità cumulata nel gruppo vaccinato dovrebbe essere inferiore al 25%. Volendo quindi evidenziare una diminuzione della mortalità del 35% legata alla vaccinazione e considerando un errore di primo tipo $\alpha=0.05$ e una potenza del test $1-\beta = 0.85$ la numerosità campionaria per due proporzioni necessaria ad evidenziare tale differenza è risultata pari a 34 animali per gruppo. Inoltre, nelle vasche soggette a vaccinazione e successivo challenge, così come nella vasca avente funzione di controllo negativo, sono stati previsti quattro campionamenti di 5 soggetti per valutare l'induzione della risposta immunitaria da parte dei vaccini. Pertanto in ogni vasca sono stati introdotti 54 animali. In totale sono stati utilizzati 608 animali, il cui utilizzo è stato approvato dal Ministero della Salute con l'autorizzazione alla sperimentazione nr° 105/2019-PR del 04/02/2019 e condotto rispettando le normative vigenti in materia di Benessere Animale. In tutte le fasi di stabulazione e durante le prove sperimentali sono state adottate

misure precauzionali per limitare il più possibile condizioni stressanti per gli animali. L'accesso ai locali è stato limitato allo stretto necessario e consentito solo al personale autorizzato. La manipolazione degli animali, ridotta al minimo, è stata effettuata sempre da personale con la debita formazione e sotto la supervisione degli sperimentatori competenti e responsabili per il progetto e del veterinario designato secondo quanto previsto dal D. Lgs. 26/2014.

Allestimento e controllo dei vaccini sperimentali

I vaccini a DNA per VHS e IHN sono stati ingegnerizzati presso la Technical University of Denmark - National Institute of Aquatic Resources (DTU), e forniti ad una ditta nazionale autorizzata, la quale ha prodotto i lotti sperimentali in accordo alle Good Manufacturing Practices. Le sequenze di interesse sono state inserite nel vettore pVax1™ (Invitrogen). La sequenza del gene G di VHS utilizzata per la generazione del vaccino a DNA è stata ottenuta dal ceppo VHS/O.mykiss/I/TN/67/Feb15 isolato in Italia nel 2015. Questo virus è classificato come VHS genotipo Ia1 cluster D secondo la classificazione di Kahns et al. (2012) e Abbadi et al. 2016 (Figura 10). La sequenza del gene G di IHN utilizzata per la generazione del vaccino a DNA è stata ottenuta dal ceppo IHN/O.mykiss/I/TN/86/Feb15 isolato in Italia nel 2015. Questo virus è classificato come IHN genotipo E secondo la classificazione di Enzmann et al. (2005) (Figura 11). Entrambi i virus rappresentano gli isolati più recenti al momento della progettazione e produzione dei vaccini. Seguendo le indicazioni DTU, che ha progettato i vaccini ed ha un'esperienza pluriennale nello studio della vaccinazione a DNA per le malattie oggetto di studio, le dosi previste per le prove sono state di 0,1 µg/pesce e 1 µg/pesce.

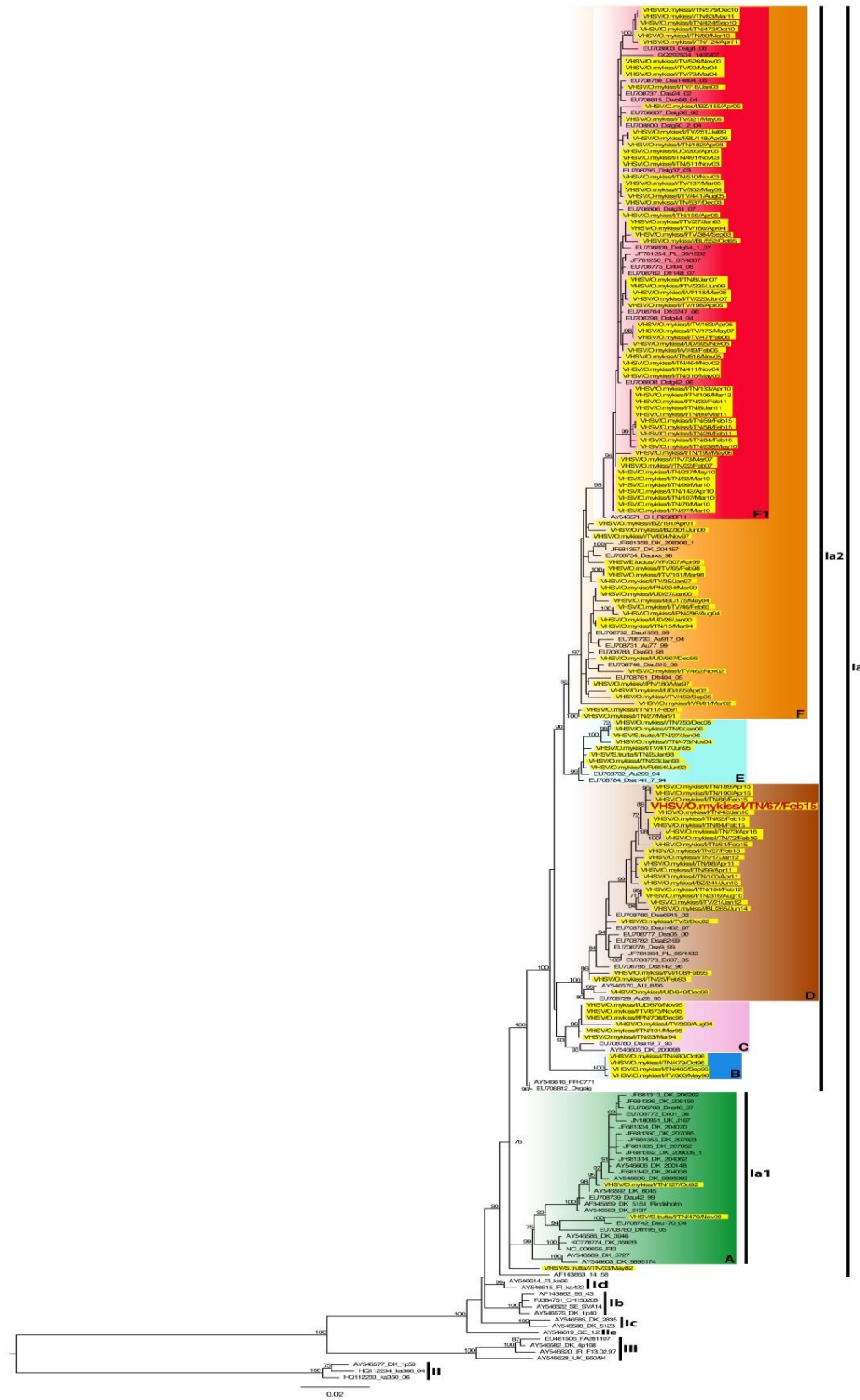


Figura 10: Albero filogenetico basato sulla sequenza completa del gene G di VHS. In giallo sono evidenziati alcuni dei ceppi italiani circolanti nelle regioni Friuli Venezia Giulia, Veneto e Trentino Alto Adige. Il virus utilizzato per la generazione del plasmide è evidenziato in rosso. Le linee verticali indicano la suddivisione in diversi genogruppi e sublineaggi. I box colorati evidenziano i differenti cluster genetici identificati all'interno del sublineaggio Ia1 e Ia2 (Kahns et al., 20124; Abbadi et al., 2016). I valori di posterior probability ≥ 70 sono riportati per ciascun nodo. La scale bar indica il numero di sostituzioni.

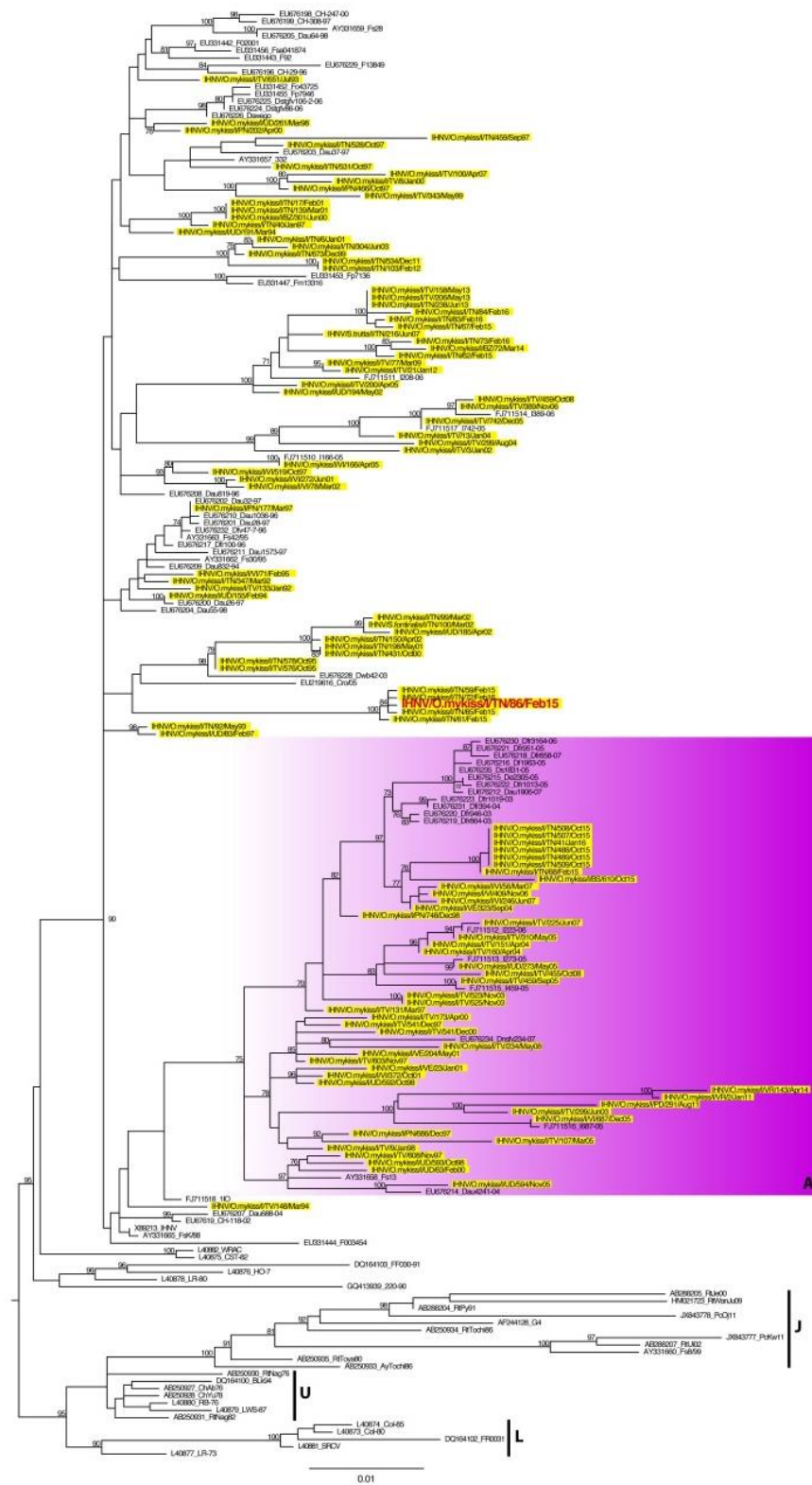


Figura 11: Albero filogenetico basato sulla sequenza completa del gene G di IHN. In giallo sono evidenziati alcuni dei ceppi italiani circolanti nelle regioni Friuli Venezia Giulia, Veneto e Trentino Alto Adige. Il virus utilizzato per la generazione del plasmide è evidenziato in rosso. Le linee verticali indicano la suddivisione in diversi genogruppi e sublineaggi. Il box colorato evidenzia il cluster genetico identificato all'interno del sublineaggio E (Enzmann et al., 2005; Abbadi et al., 2016). I valori di posterior probability ≥ 70 sono riportati per ciascun nodo. La scale bar indica il numero di sostituzioni.

Per la valutazione della qualità dei lotti prodotti sono state condotte diverse prove preliminari al termine delle quali è stata allestita la seguente prova di trasfezione cellulare con i vaccini introdotti in cellule EPC tramite veicolazione con Polietilenimina (PEI). In dettaglio, cellule EPC, mantenute con Minimum Essential Medium (MEM) (Sigma Aldrich) addizionato di antibiotici, L-glutamina e Siero Fetale Bovino (SBF) al 10%, sono state seminate con rapporto 1:6 in 6 pozzetti addizionati di vetrino su tre piastre da 24 pozzetti, per un totale di 18 pozzetti. Dopo 24 h dalla semina, il terreno di coltura è stato prelevato da ogni pozzetto e sostituito con la soluzione di trasfezione. Quest'ultima comprendeva 120 µl di Optimem® I-1x (GIBCO), un terreno di coltura cellulare a ridotta concentrazione di siero, 1 µg di plasmide e 2 µl di JetPEI® (Polyplus) prediluita in 50 µl di buffer fornito con la PEI. In ogni piastra, i plasmidi per VHS e IHN sono stati inoculati in duplicato. Per i controlli negativi, i pozzetti sono stati inoculati con la soluzione di trasfezione privata del plasmide. Le piastre sono state poste in agitazione lenta per 10 minuti e successivamente incubate a 25 °C per 6 h. Al termine del periodo di trasfezione, la soluzione è stata rimossa dai pozzetti e sostituita con 500 µl di MEM al 2% di SBF. L'incubazione è proseguita a 15°C fino all'esecuzione della prova di immunofluorescenza, avvenuta a 5 gg, 7gg e 10 gg post trasfezione.

Trascorsi i giorni previsti, prima di procedere alla prova di immunofluorescenza, le piastre sono state osservate al microscopio ottico per la valutazione del tappeto cellulare. Da una piastra è stato rimosso il terreno di coltura e le cellule fissate con acetone all'80% in Phosphate Buffered Saline (PBS) per 30 minuti a temperatura ambiente. Dopo la fissazione, l'acetone è stato rimosso e sostituito con PBS-Tween allo 0,05%. Le piastre sono state poste in agitazione per 5 minuti per essere successivamente svuotate dalla soluzione di lavaggio. Il procedimento è stato ripetuto due volte.

200 µl di siero anti VHS e anti IHN sono stati inoculati nei pozzetti contenenti i relativi plasmidi e uno dei pozzetti adibiti a controlli negativi e lasciati reagire 30 minuti a 37°C.

Successivamente la piastra è stata lavata come descritto precedentemente per 3 volte. 200 µl di siero anti immunoglobuline di coniglio coniugato con FITC sono stati inoculati in tutti i pozzetti e lasciati reagire per 30 minuti a 37°C. La piastra è stata nuovamente sottoposta a lavaggio. I vetrini sono stati prelevati dai pozzetti e montati su una goccia di glicerolo al 50% in PBS con la superficie cellulare rivolta verso il basso. La lettura dei vetrini è stata effettuata con microscopio Axioskop Zeiss equipaggiato con modulo per fluorescenza Ebq 100 Isolated e con un microscopio confocale Leica TCS SP8. All'osservazione al microscopio ottico, i controlli negativi sono risultati ottimali per tutta la durata della prova. Le cellule trattate con i

plasmidi hanno evidenziato segni di sofferenza verso i 7 e 10 gg, mantenendo comunque una copertura adeguata del vetrino. I controlli negativi hanno evidenziato, all'osservazione con il microscopio a fluorescenza, un moderato livello di fluorescenza di fondo causato principalmente da cellule apoptotiche e pertanto si è ricorso all'osservazione al microscopio confocale con un netto miglioramento della capacità di lettura dei vetrini.

All'osservazione al confocale, a 5 gg solo le cellule trasfettate con il plasmide per VHS sono risultate positive per l'espressione della glicoproteina G (Figura 12), mentre per il plasmide per IHN si sono evidenziate deboli positività a 7 gg (Figura 13), diventate più evidenti a 10 gg (Figura 14)

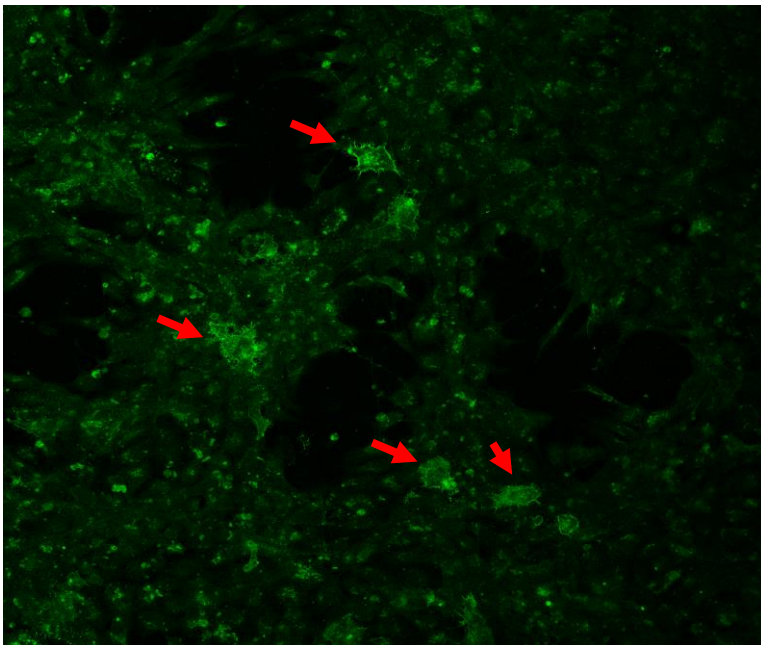


Figura 12: Cellule EPC 5 gg post trasfezione con plasmide VHS a 5 gg post trasfezione.

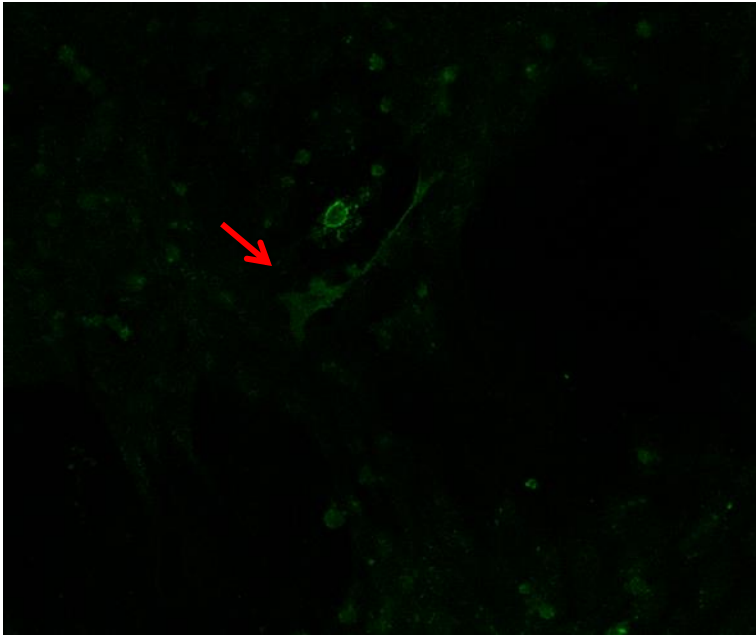


Figura 13: Cellule EPC 7 gg post trasfezione con plasmide IHN. Appaiono i primi segnali di positività, caratterizzati da poche cellule esprimenti la glicoproteina G a livello di membrana citoplasmatica

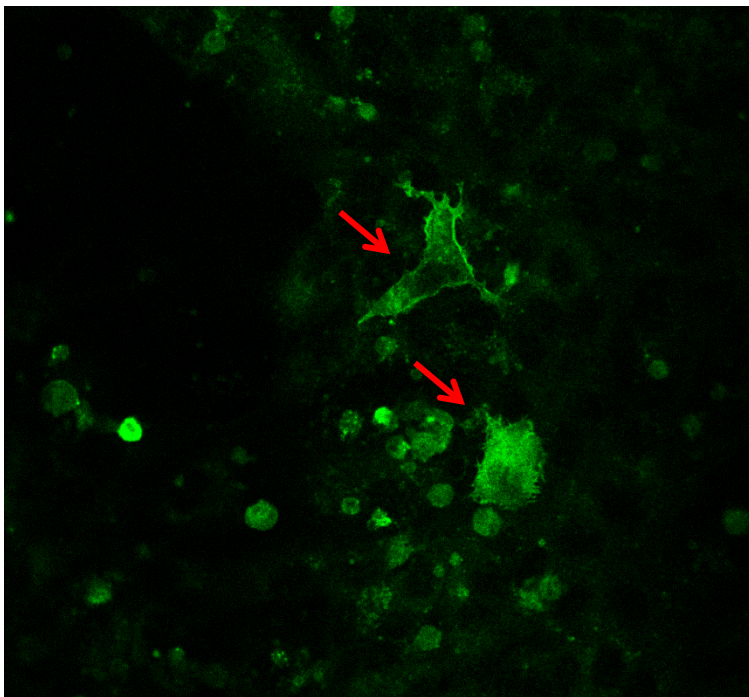


Figura 14: Cellule EPC positive 10 gg post trasfezione con plasmide IHN.

Virus di challenge

I ceppi di VHS e IHN utilizzati per il challenge della prova di Potency sono stati selezionati nel corso di una prova di patogenicità condotta precedentemente nell'ambito di un altro progetto IZSVe (progetto ANIHWA-NOVIMARK). Tra i diversi ceppi testati, sono stati scelti i virus in grado di causare una mortalità cumulativa superiore al 60% e tra i più recenti. Quest'ultimo parametro risulta di particolare importanza specialmente per l'IHN, a fronte dell'alta variabilità nucleotidica che questo virus presenta e che fa supporre una elevato velocità evolutiva (Abbadi et al., 2016). Per il VHS è stato scelto il ceppo VHS/O.mykiss/I/TN/92-1/Feb19, che ha provocato mortalità pari a 100%, mentre per l'IHN è stato selezionato il ceppo IHN/O.mykiss/I/TN/220-2/Mar18, che ha indotto una mortalità del 95%. Per la prova di Potency, i lotti dei due virus sono stati prodotti tramite coltura su monostrato cellulare (BF2 per il VHS e EPC per l'IHN) e sottoposti a titolazione tramite metodo indiretto secondo la formula di Reed e Muench ed espressi in TCID₅₀/ml.

Disegno Sperimentale

La schematizzazione del disegno sperimentale è riportata in Figura 15. Per valutare la sicurezza dei vaccini oggetto di studio, è stato allestito un Safety Test. Gli animali introdotti nelle vasche 5 e 6 sono stati inoculati con il doppio della dose massima prevista dal progetto. Gli animali sono stati prelevati dalla vasca e anestetizzati per bagno con tricaina metansulfonato (Tricaine, Pharmaq) alla dose di 100 ppm. Al raggiungimento di un livello di anestesia adeguato, gli animali sono stati inoculati per intramuscolo nella muscolatura epiassiale sinistra a livello della pinna dorsale con 2 µg di plasmide sospeso in 100 µl di PBS sterile, prima di essere reintrodotti nella vasca di origine. Gli animali sono stati osservati nell'ora successiva per valutare il corretto risveglio e monitorati per 14 gg per la comparsa di eventuali anomalie e segni di sofferenza, in accordo alle indicazioni riportate nella Farmacopea Europea. Al termine del periodo di monitoraggio, gli animali sono stati soppressi tramite overdose di tricaina metansulfonato (Tricaine, Pharmaq). Campioni di muscolo nel punto di inoculo sono stati prelevati da 5 soggetti e fissati in formalina tamponata al 10% per la valutazione istologica della eventuale comparsa di lesioni. Per la valutazione dell'efficacia, il Potency Test ha previsto la vaccinazione degli animali con due dosi diverse di prodotto, in singolo per VHS e IHN e con entrambi i presidi (vedasi sezione "Animali" per la ripartizione

delle vasche). Gli animali sono stati prelevati dalla vasca e anestetizzati per bagno con tricaina metansulfonato (Tricaine, Pharmaq) alla dose di 100 ppm. Al raggiungimento di un livello di anestesia adeguato, gli animali sono stati inoculati per intramuscolo nella muscolatura epiassiale sinistra a livello della pinna dorsale con 0,1 e 1 µg di plasmide sospesi in 100 µl di PBS sterile, prima di essere reintrodotti nella vasca di origine. Per la doppia vaccinazione sono state preparate soluzioni contenenti entrambi i plasmidi allo stesso volume di inoculo. Un gruppo di controllo negativo (Vasca 7) per le procedure di vaccinazione è stato allestito inoculando gli animali con 100 µl di PBS sterile. Nei giorni successivi alla vaccinazione l'osservazione degli animali è stata intensificata (da 2 a 4 volte al giorno) e qualunque anomalia segnalata. Gli animali sono stati osservati per 60 giorni post vaccinazione.

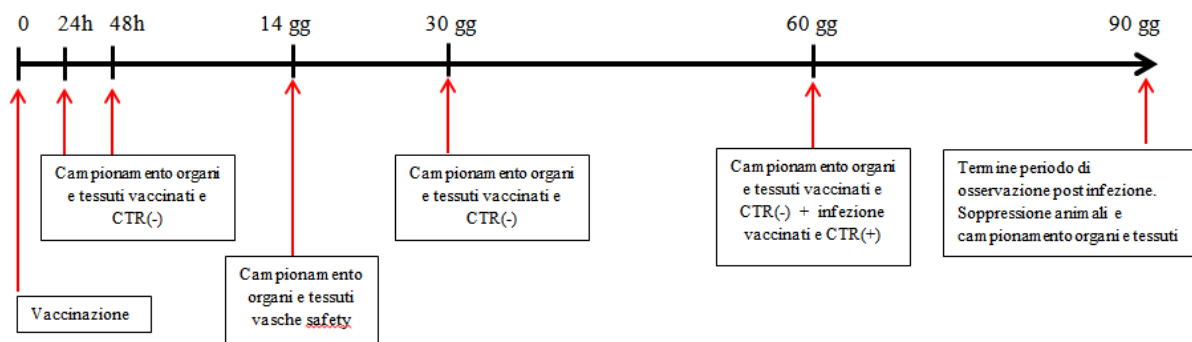


Figura 15: Schematizzazione del disegno sperimentale

Per valutare l'andamento della risposta immunitaria a seguito della vaccinazione, 5 soggetti scelti casualmente sono stati soppressi da ogni vasca sottoposta a trattamento e dalla Vasca 7 a 24 h, 48h, 30 gg e 60 gg post vaccinazione. Da questi soggetti sono stati campionati milza, rene cefalico, sangue, intestino e muscolo secondo la Tabella 6. I campioni di rene cefalico e milza campionati sono stati conservati in soluzione RNALater[®] a 4°C per 24 h. Successivamente la soluzione conservativa è stata eliminata e i campioni conservati a -80°C in attesa delle analisi di espressione genica previste in futuro. Il sangue è stato prelevato dagli animali sottoposti ad anestesia per bagno e raccolto in provette senza anticoagulante per ottenere il siero. In dettaglio, i campioni sono stati mantenuti a temperatura ambiente per circa 4h h e successivamente a 4°C overnight prima di essere centrifugati. Il siero è stato prelevato e conservato a -80°C in attesa di essere analizzato per la presenza di anticorpi anti VHS e anti IHN tramite sieroneutralizzazione e metodica ELISA. I campioni di muscolo sono stati

immessi in formalina tamponata al 10% e conservati a temperatura ambiente fino alla processazione istologica ed immunohistochimica. L'intestino è stato prelevato e conservato a -80°C fino all'esecuzione della metodica di PCR progettata per la ricerca del plasmide.

Tabella 6: Campionamenti effettuati per la valutazione della risposta immunitaria indotta dalla vaccinazione. La Vasca 7 ha svolto da controllo negativo.

Organo	24h	48h	30gg	60gg	Analisi
Milza	Vasche 7,11,12,13,14,15, 16	Vasche 7,11,12,13,14,15, 16	Vasche 7,11,12,13,14,15, 16	Vasche 7,11,12,13,14,15, 16	Espressione genica
Rene	Vasche 7,11,12,13,14,15, 16	Vasche 7,11,12,13,14,15, 16	Vasche 7,11,12,13,14,15, 16	Vasche 7,11,12,13,14,15, 16	Espressione genica
Sangue	Vasche 7,11,12,13,14,15, 16	Vasche 7,11,12,13,14,15, 16	Vasche 7,11,12,13,14,15, 16	Vasche 7,11,12,13,14,15, 16	Sieroneutralizzazione, Elisa
Muscolo	Vasche 7,11,12,13,14,15, 16	Vasche 7,11,12,13,14,15, 16	Vasche 7,11,12,13,14,15, 16	Vasche 7,11,12,13,14,15, 16	Istologia, Immunohistochimica
Intestino	NON campionato	NON campionato	Vasche 7,11,12,13,14,15, 16	Vasche 7,11,12,13,14,15, 16	PCR ricerca plasmide

Dopo 60 giorni dalla vaccinazione, gli animali sono stati infettati per bagno con una dose pari a 10^4 TCID₅₀/ml dei ceppi selezionati di VHS e IHN singolarmente (Vasche 11-12-13-14 immunizzati per singola malattia), o in combinazione (Vasche 15-16 vaccinati per VHS e IHN). I rispettivi gruppi controllo non vaccinati (Vasche 8-9-10) sono stati infettati seguendo il medesimo criterio. La Vasca 7, avente funzione di controllo negativo, è stata trattata con il terreno per colture cellulari (MEM) utilizzato per le produzioni dei virus impiegati nelle infezioni. In dettaglio, in ogni vasca è stato arrestato il ricambio dell'acqua e il volume fatto calare a 20 litri. Ogni soluzione virale è stata portata ad un volume finale di 200 ml tramite diluizione in MEM in modo da uniformare i volumi utilizzati per l'infezione (Figura 16), prima di essere versata nella vasca di destinazione. Dopo circa 10 minuti, un campione di acqua di infezione da sottoporre a real time PCR e titolazione in coltura cellulare tramite metodo statistico di Spearman-Kärber è stato prelevato da ogni vasca. L'infezione è stata condotta per 2 ore al termine delle quali il ricambio e il volume d'acqua sono stati ripristinati

alle condizioni precedenti. Il protocollo prevedeva di interrompere la procedura al minimo segno di sofferenza degli animali. Gli animali infettati sono stati osservati giornalmente per 30 gg per monitorare l'andamento della mortalità. Poiché i segni clinici delle malattie in esame sono caratteristici, la comparsa del nuoto irregolare e dell'esoftalmo che generalmente nelle infezioni naturali esita con la morte degli animali è stata considerata l'endpoint umanitario dello studio. Tutti i soggetti che hanno presentato anomalie natatorie, melanosi ed esoftalmo sono stati sacrificati mediante overdose di anestetico.

Da tutti i soggetti soppressi nelle vasche trattate con i vaccini per entrambe le malattie sono stati campionati milza e rene da sottoporre a real time RT-PCR per VHS e IHN secondo i protocolli descritti da Overturf, Lapatra, & Powell, (2001) e Purcell, Hart, Kurath, & Winton, (2006) per IHN e da Jonstrup, Kahns, Skall, Boutrup, & Olesen, (2013) per VHS in modo da determinare il virus responsabile della sintomatologia. Al termine del periodo di osservazione, gli animali sopravvissuti sono stati soppressi tramite overdose di tricaina metansulfonato (Tricaine, Pharmaq).



Figura 16: Procedura di infezione per bagno: il volume dell'acqua è stato abbassato e il flusso interrotto. Circa 200 ml di soluzione infettante sono stati aggiunti in ogni vasca. L'aerazione è stata mantenuta vigorosa per le 2h di esposizione previste dal protocollo sperimentale. Gli animali sono stati osservati per individuare l'insorgere di eventuali segni di sofferenza.

Dai soggetti sopravvissuti nelle vasche vaccinate con la dose più alta e nelle vasche di controllo positivo, sono stati campionati rene cefalico e milza da sottoporre a real time RT-PCR quantitativa per i virus utilizzati. Sono stati campionati inoltre intestino e porzioni di muscolo circostanti il punto di inoculo delle vasche trattate con la dose più alta di vaccino per la valutazione tramite PCR della eventuale persistenza ed eliminazione dei plasmidi. Per ogni vasca è stata calcolata la mortalità cumulativa al termine dei 30 gg di osservazione. Per le vasche trattate con i vaccini è stata altresì calcolata la Percentuale Relativa di Sopravvivenza (RPS) secondo la seguente formula:

$$RPS = \left[1 - \frac{n^{\circ} \text{ morti vasca trattata}}{n^{\circ} \text{ morti vasca relativo controllo positivo}} \right] \times 100$$

Per analizzare l'effetto dei presidi vaccinali è stata utilizzata l'analisi di Kaplan-Meier, ottenendo la rappresentazione grafica delle probabilità di sopravvivenza ad ogni evento di mortalità per tutta la durata della prova di challenge. Una volta verificata la proporzionalità dei rischi, è stato possibile utilizzare il modello semiparametrico di Cox per confrontare i diversi gruppi sperimentali. Per valutare l'uguaglianza delle funzioni di sopravvivenza dei diversi trattamenti messi a confronto è stato utilizzato il test dei ranghi logaritmici (van Belle et al. 2004). Le analisi statistiche sono state condotte tramite il software statistico STATA 12.

Risultati

A seguito delle procedure di vaccinazione e nel corso dell'infezione per bagno non si sono evidenziati segni di sofferenza e mortalità in nessuna vasca trattata.

Il gruppo controllo negativo non ha presentato alcuna mortalità in nessun momento della sperimentazione. Per quanto concerne il Safety Test, nei 14 gg seguenti la vaccinazione con doppia dose massima non sono stati evidenziate negli animali alterazioni comportamentali, lesioni nel punto di inoculo o altri segni di sofferenza. Per entrambi i plasmidi, a livello istologico come prevedibile è stato osservato nello spessore della muscolatura epiaassiale, in prossimità del sito di inoculo, un area focale (fascio trasversale) di intenso infiltrato infiammatorio mononucleato in 4 soggetti su 5 esaminati.

Nell'ambito del Potency Test, i risultati delle real time RT-PCR per IHN e VHS e delle titolazioni su coltura cellulare effettuate sui campioni di acqua di infezione sono riportati nella Tabella 7 e hanno confermato la corretta esecuzione dell'infezione per bagno. I titoli virali si sono infatti mantenuti conformi al titolo prefissato pari a 10^4 TCID₅₀/ml.

Tabella 7: Risultati delle analisi sui campioni di acqua prelevati circa 10 minuti dopo l'inizio del bagno di infezione. Per le real time RT-PCR (qualitative) sono riportati i valori di cycle threshold (Ct) osservati.

Vasca	RT-PCR IHN	RT-PCR VHS	Titolo TCID ₅₀ /ml
Vasca 7 – Ctrl Neg	Neg	Neg	< 10 ¹
Vasca 8 – Ctrl- VHS+IHN	25,98	26,99	10 ^{4,30}
Vasca 9 – Ctrl VHS	Neg	26,87	10 ^{4,55}
Vasca 10 – Ctrl IHN	24,38	Neg	10 ^{4,55}
Vasca 11 – VHS 0,1	Neg	26,94	10 ^{4,55}
Vasca 12 – VHS 1	Neg	26,89	10 ^{4,55}
Vasca 13 – IHN 0,1	24,27	Neg	10 ^{4,55}
Vasca 14 – IHN 1	24,15	Neg	10 ^{4,30}
Vasca 15 – VHS IHN 0,1	24,92	26,86	10 ^{4,55}
Vasca 16 – VHS IHN 1	25,89	27,30	10 ^{4,55}

Le mortalità evidenziate nei gruppi di controllo positivi sono risultate elevate nelle vasche infettate con VHS e entrambi i virus simultaneamente (rispettivamente 92,45% e 85,19%), mentre la vasca infettata solo con IHN ha presentato una mortalità più bassa, pari al 38,18%. La dose vaccinale pari a 0,1 µg/pesce ha prodotto RPS pari al 50,11% nei confronti di VHS,

al 38,38% contro IHN e 25,83% nei confronti della coinfezione. RPS più alte sono state riscontrate alla dose pari a 1 µg/pesce: 78,93% contro VHS, 73,13% per IHN e 48,76% per la coinfezione.

Le mortalità cumulative osservate nell'ambito del Potency Test (Figura 17) e le RPS dei diversi presidi vaccinali (Figura 18) riscontrate sono riportate nei grafici sottostanti e nella Tabella 8.

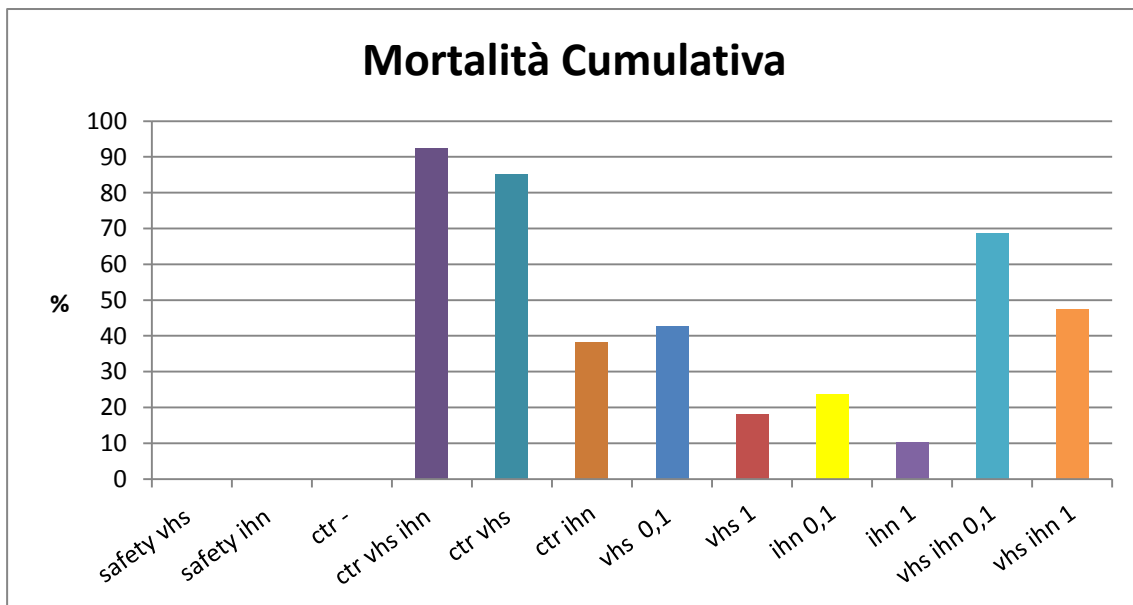


Figura 17: Mortalità cumulativa al termine dei 30 giorni post infezione

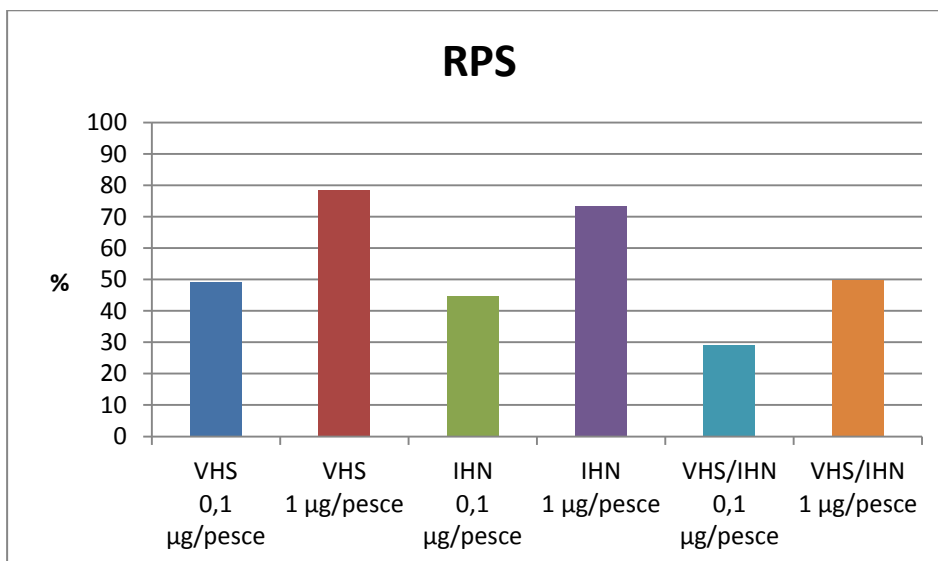


Figura 18: RPS ottenute nelle vasche vaccinate al termine dei 30 gg post infezione.

Tabella 8: Mortalità cumulative e RPS osservate al termine dei 30 gg post infezione. NA= non applicabile

Vasca	Mortalità (%)	RPS
Vasca 5 - safety VHS	0	NA
Vasca 6 - safety IHN	0	NA
Vasca 7 – Ctrl Neg	0	NA
Vasca 8 – Ctrl- VHS+IHN	92,45	NA
Vasca 9 – Ctrl VHS	85,19	NA
Vasca 10 – Ctrl IHN	38,18	NA
Vasca 11 – VHS 0,1	42,50	50,11
Vasca 12 – VHS 1	17,95	78,93
Vasca 13 – IHN 0,1	23,53	38,38
Vasca 14 – IHN 1	10,26	73,14
Vasca 15 – VHS IHN 0,1	68,57	25,83
Vasca 16 – VHS IHN 1	47,37	48,76

Tabella 9: Risultati delle real time RT-PCR effettuate su campioni di milza e rene prelevati dai soggetti soppressi nella vasca 16 (vaccino bivalente 1 µg-coinfetti) espressi in Ct. Dei 18 soggetti campionati, uno è risultato inadatto all'esecuzione delle analisi.

ID	Data mortalità	Milza		Rene	
		IHN	VHS	IHN	VHS
Soggetto 1	28/09/2019	22,3	21,67	23,3	16,94
Soggetto 2	29/09/2019	28,11	22,57	27,7	17,46
Soggetto 3	29/09/2019	13,69	22,65	15,38	21,75
Soggetto 4	30/09/2019	14,97	23	19,11	24,43
Soggetto 5	03/10/2019	16,91	0	21,89	0
Soggetto 6	04/10/2019	15,97	30,01	20,48	0
Soggetto 7	04/10/2019	16,5	31,27	21,49	0
Soggetto 8	04/10/2019	27,06	31,94	0	0
Soggetto 9	05/10/2019	19,42	0	22,92	0
Soggetto 10	05/10/2019	24,98	0	31,21	0
Soggetto 11	06/10/2019	26,15	0	29,91	0
Soggetto 12	07/10/2019	15,15	0	20,82	0
Soggetto 13	10/10/2019	15,35	0	20,98	0
Soggetto 14	11/10/2019	27,82	0	32,69	0
Soggetto 15	17/10/2019	31,57	0	0	0
Soggetto 16	20/10/2019	21,8	0	24,31	0
Soggetto 17	23/10/2019	0	0	0	0
Soggetto 18	Inadatto	Inadatto	Inadatto	Inadatto	Inadatto

I risultati delle real time RT-PCR effettuate sui campioni di milza e rene prelevati dai soggetti morti/malati delle vasche 16 (18 soggetti), trattati con entrambi i plasmidi alla dose di 1 µg/pesce sono riportati nella Tabella 9.

La valutazione istologica (Figura 19) effettuata sui campioni di muscolo prelevati a 24h e 48h dopo la vaccinazione ha evidenziato per tutti i gruppi sperimentali la concomitante presenza dei seguenti quadri istologici in proporzione variabile a seconda della sezione osservata:

- Lesioni necrotiche associate a frammentazione delle fibre muscolari e lieve infiltrato infiammatorio mononucleato
- Frammentazione delle fibre muscolari
- Lieve infiltrato infiammatorio mononucleato
- Assenza di lesioni.

I campioni prelevati a 30 giorni dopo la vaccinazione hanno mostrato la presenza di vari gradi di infiltrato infiammatorio mononucleato e assenza di lesioni istologiche.

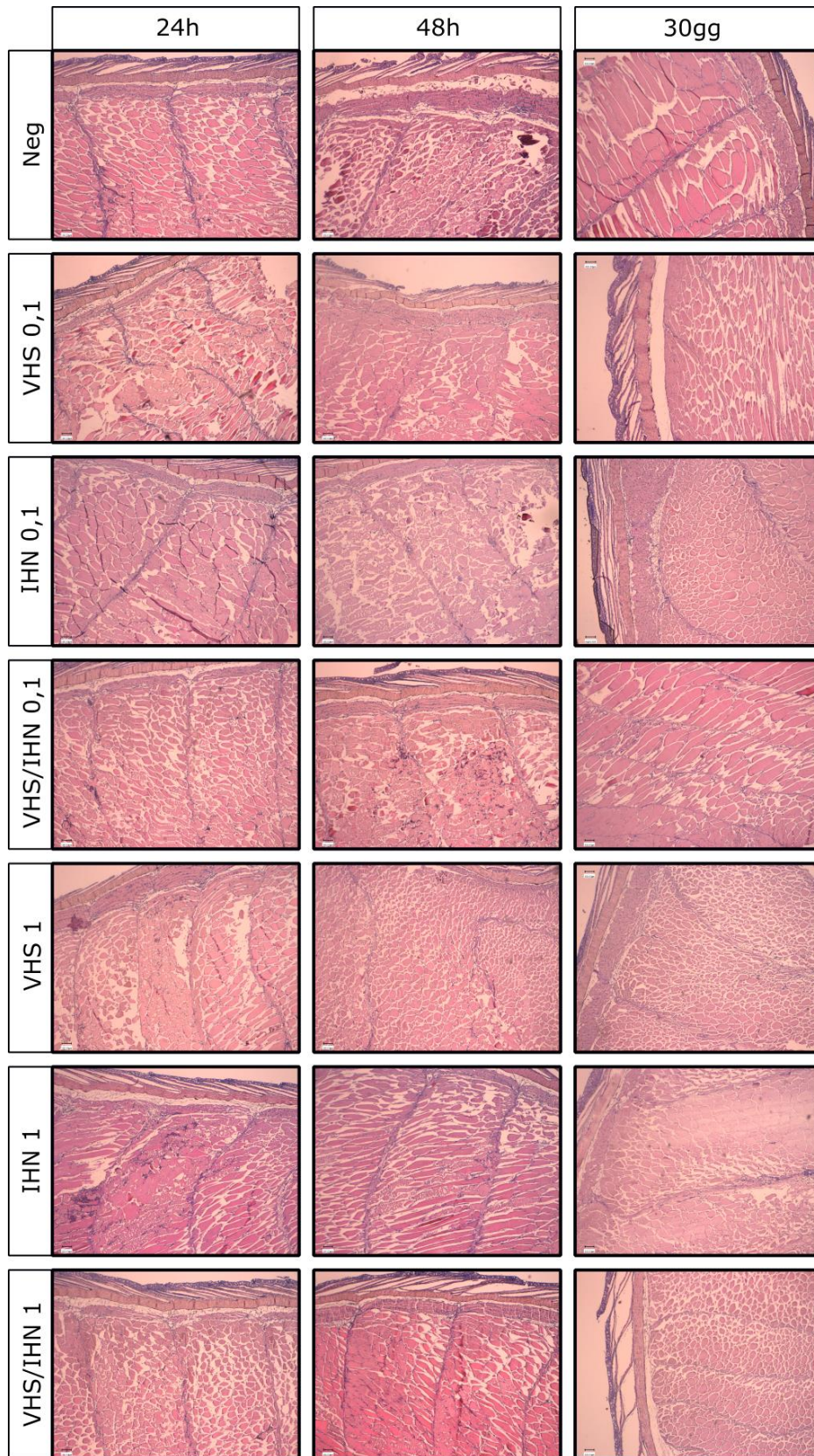


Figura 19: Valutazione istologica del muscolo epiaissiale sinistro, sede di inoculo, a 24h, 48h e 30 gg post vaccinazione per tutti i gruppi sperimentali. Sezione longitudinale, Ematossilina & Eosina, ingrandimento 50X.

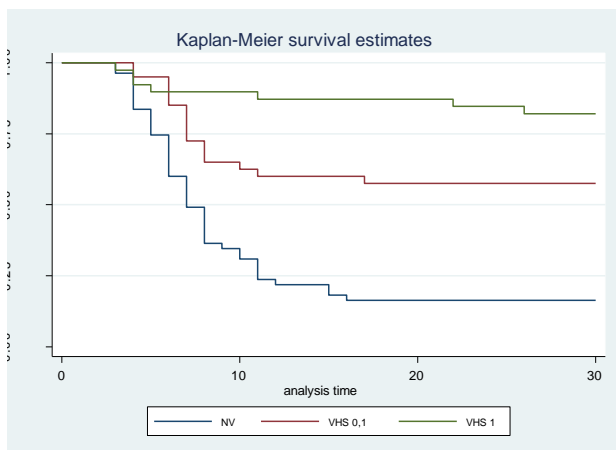


Figura 20: Curve di sopravvivenza Kaplan-Meier dei gruppi sperimentali infettati con VHS. NV: vasca controllo non vaccinata. VHS 0,1: vasca trattata con plasmide per VHS alla dose di 0,1 µg/pesce. VHS 1: vasca trattata con plasmide per VHS alla dose di 1 µg/pesce

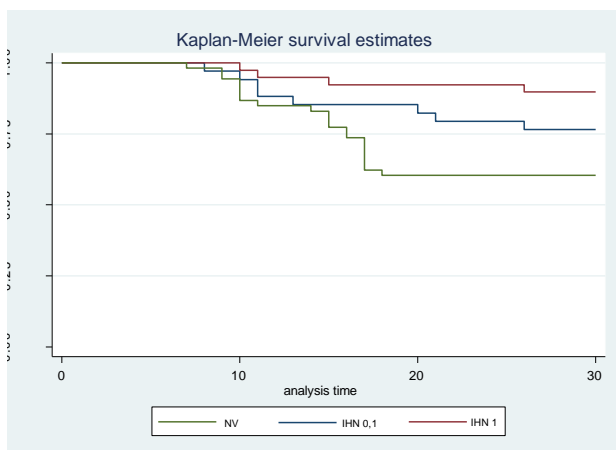


Figura 21: Curve di sopravvivenza Kaplan-Meier dei gruppi sperimentali infettati con IHN. NV: vasca controllo non vaccinata. IHN 0,1: vasca trattata con plasmide per IHN alla dose di 0,1 µg/pesce. IHN 1: vasca trattata con plasmide per IHN alla dose di 1 µg/pesce

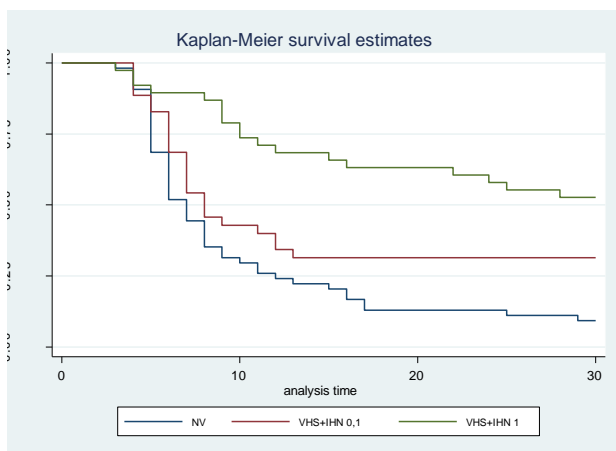


Figura 22: Curve di sopravvivenza Kaplan-Meier dei gruppi sperimentali infettati con VHS e con IHN. NV: vasca controllo non vaccinata. VHS+IHN 0,1: vasca trattata con plasmide per VHS e IHN alla dose di 0,1 µg/pesce. VHS+IHN 1: vasca trattata con plasmide per VHS e IHN alla dose di 1 µg/pesce.

Le curve di sopravvivenza ottenute con metodo Kaplan-Meier sono illustrate nelle Figure 20, 21 e 22. Per i 3 gruppi analizzati (infettati con VHS, IHN e VHS/IHN), è stata accettata l'ipotesi di proporzionalità dei rischi, permettendo di utilizzare il metodo di Cox per il confronto tra i due trattamenti effettuati (0,1 µg/pesce e 1 µg/pesce). L'analisi di Cox mostra che esiste una differenza significativa nel rischio di evento (morte) tra i trattamenti messi a confronto. Il tasso di rischio di morte nei pesci infettati con VHS e vaccinati alla dose di 0,1 µg/pesce cala del 65% rispetto ai non vaccinati e cala di quasi 88% somministrando la dose di 1 µg/pesce. Per i gruppi infettati con IHN, la vaccinazione con dose 0,1 µg/pesce per IHN riduce del 46% il rischio di morte mentre la vaccinazione alla dose di 1 µg/pesce lo riduce del 80%. Per i gruppi infettati con la combinazione di VHS e IHN, il rischio di morte è ridotto del 40% e di oltre il 70% a seguito della vaccinazione con entrambi i plasmidi alla dose 0,1 µg/pesce e 1 µg/pesce rispettivamente. I risultati delle analisi statistiche sono riassunti nella Tabella 10.

Tabella 10: Risultati delle analisi statistiche sulle curve di sopravvivenza ottenute con il metodo di Kaplan-Meier.

Gruppo sperimentale	Dose vaccino somministrata	Effetto sul tasso di rischio di morte in confronto al gruppo controllo
VHS	0,1 µg/pesce	-65%
	1 µg/pesce	-88%
IHN	0,1 µg/pesce	-46%
	1 µg/pesce	-80%
VHS/IHN	0,1 µg/pesce	-40%
	1 µg/pesce	-70%

Inoltre è stata rifiutata per tutti i gruppi l'ipotesi di uguaglianza delle funzioni di sopravvivenza confrontate, supportando la validità statistica dei dati ottenuti.

Discussioni

Nonostante gli sforzi impiegati per l'eradicazione, la VHS e la IHN continuano a provocare importanti danni economici al settore della trotticoltura italiana. Nonostante la vaccinazione sia autorizzata nelle zone non dichiarate indenni, al momento attuale non sono disponibili presidi vaccinali di alcuna tipologia autorizzati all'immissione sul commercio. Tra le tipologie di vaccini studiate, i vaccini inattivati hanno presentato la difficoltà di mantenere le proprietà antigeniche della glicoproteina G a seguito delle procedure di inattivazione (Gudding et al., 2014). I vaccini a DNA, per le caratteristiche intrinseche e le modalità di funzionamento, non presentano simili limitazioni e hanno mostrato di indurre un'ottima protezione e rappresentano un'alternativa economicamente conveniente (Collins et al., 2019). La valutazione della sicurezza e dell'efficacia di tali presidi risulta fondamentale per avviare il percorso di autorizzazione all'immissione sul mercato di un vaccino per far fronte alle richieste degli addetti al settore.

I risultati ottenuti nel corso di questo studio hanno evidenziato l'elevata efficacia e sicurezza dei vaccini a DNA sviluppati e testati nei confronti di ceppi italiani di VHS e IHN. Tutti i protocolli vaccinali utilizzati hanno infatti mostrato di essere utili a ridurre la mortalità di trote infettate artificialmente, anche se in misura variabile in relazione al prodotto e alla dose somministrata. I valori di mortalità ottenuti nel gruppo controllo positivo IHN non sono stati quelli previsti. Un gruppo di pesci dello stesso lotto di quello usato per la prova di vaccinazione era stato infettato precedentemente con lo stesso ceppo di IHN, IHN/O.mykiss/ITN/220-2/Mar18, nell'ambito di un altro progetto. In quel caso, la mortalità era stata del 95% mentre nello studio in oggetto la mortalità cumulativa osservata ha raggiunto il 38,18%. La discrepanza osservata è stata ricondotta alla differenza di taglia dei due gruppi di animali: il primo gruppo presentava una taglia media di circa 3 grammi, mentre gli animali del presente studio pesavano circa 10 grammi al momento della vaccinazione e sono quindi stati infettati ad una taglia ancora superiore (stimata a 15 gr). È noto che il decorso della malattia provocata dall'infezione da IHN è fortemente influenzato dalla taglia degli animali colpiti. In infezioni sperimentali per bagno effettuate da Bergmann et al. (2003), un ceppo tedesco di IHN ha indotto il 100 % di mortalità in avannotti di 2,5-3 grammi di peso, il 53 % in soggetti di 15-20 grammi e il 20 % in pesci dal peso compreso tra i 40 e i 50 grammi.

Nel caso del presente studio, nonostante la differenza statisticamente significativa tra la mortalità presentata dal gruppo controllo positivo IHN e i gruppi vaccinati, la mortalità cumulativa ottenuta è stata inferiore al 60% valore previsto dalla Farmacopea Europea per la valutazione dell'efficacia dei presidi vaccinali e pertanto il dato di RPS per questo vaccino non può essere considerato sufficientemente robusto e andrebbe ulteriormente approfondito.

I vaccini alle concentrazioni di 1 µg/pesce hanno presentato una RPS superiore a quella dei vaccini a concentrazione minore e nel caso delle infezioni singole sempre superiori al 70%. Nel caso della coinfezione invece la RPS è stata di poco inferiore al 50%, valore promettente, ma non ai livelli desiderati. Per indagare il motivo alla base della minor efficacia della vaccinazione bivalente sono state condotte quindi ulteriori prove di caratterizzazione del plasmide e delle cause di mortalità mediante metodica molecolare del gruppo covaccinato e coinfectato. Le prove di trasfezione su cellule EPC hanno evidenziato nelle prove *in vitro* una efficienza inferiore del plasmide codificante la glicoproteina di IHN rispetto a quello codificante VHS. Questa minore capacità del plasmide IHN di indurre la sintesi proteica nelle cellule di pesce, potrebbe essere alla base della ridotta RPS osservata. Le RT-PCR quantitative effettuate sugli organi campionati dai soggetti della vasca 16 (vaccinati con entrambi i vaccini ed infettati con entrambi i virus) e morti nel corso della prova hanno infatti evidenziato come l'IHN sia stato responsabile della maggior parte dei casi clinici/decessi.

Come già evidenziato precedentemente, nel gruppo vaccinato solo IHN e infettato con il virus omologo, la ridotta mortalità causata dall'IHN in singolo ha alterato la % di RPS rendendo il vaccino apparentemente più efficace di quanto non fosse in realtà. Questo effetto non si è osservato invece nel gruppo sottoposto alla coinfezione probabilmente per un effetto sinergico dei due virus. Pochi studi hanno investigato la coinfezione di VHS e IHN. In una prova sperimentale effettuata infettando per bagno esemplari di trota iridea del peso di 50 grammi, la coinfezione aveva indotto una mortalità cumulativa lievemente più bassa rispetto ai gruppi infettati con i singoli virus, pur non essendo statisticamente diversa (Fregeneda-Grandes, Skall, & Olesen, 2009). Brudeseth et al., (2002) ha evidenziato come, nel corso della coinfezione, l'IHN avesse mostrato una distribuzione tissutale limitata e titoli più bassi rispetto che in infezione pura. Al contrario, nel corso della prova descritta nel presente studio il gruppo controllo positivo coinfecto VHS IHN ha presentato una mortalità lievemente più alta rispetto alle infezioni pure. Sono in corso le analisi degli organi campionati dai soggetti soppressi per valutare la cinetica di replicazione virale ed investigare meglio questo aspetto. Nel caso delle vasche vaccinate con entrambi i plasmidi, ad entrambe le dosi, la ridotta

efficacia vaccinale può essere pertanto attribuita sia al plasmide utilizzato, che all'effetto sinergico della coinfezione. È possibile inoltre che la patogenicità del VHS sia stata attenuata dalla risposta immunitaria indotta dalla vaccinazione, permettendo però all'IHN di replicare più facilmente ed esplicare un'attività patogena maggiore. In ogni caso, i motivi alla base della ridotta RPS conferita dalla doppia vaccinazione non sono ancora stati chiariti del tutto e meritano ulteriori approfondimenti. Le analisi dei sieri prelevati ai diversi time point e le analisi di trascrittomiche previste in futuro saranno utili anche per approfondire anche questo aspetto.

In confronto ad altri studi condotti sull'utilizzo dei vaccini a DNA, le RPS riscontrate nel presente studio sono risultate più basse. Variabili come la diversa patogenicità tra ceppi virali usati, le condizioni sperimentali e strutturali diverse, la genetica degli animali, nonché il diverso vettore plasmidico utilizzato possono essere responsabili della differenza riscontrata. Il confronto con altri autori fa ipotizzare che uno dei fattori critici possa essere il volume di inoculo utilizzato nel presente studio. Altri autori hanno diluito le quantità di vaccini a DNA previste nei protocolli sperimentali, variabili tra i 0,1 µg a 1 µg, in 25 o 50 µl di soluzione (Lorenzen et al., 2000; Sepúlveda et al., 2019), mentre nella prova sperimentale sopradescritta il volume di inoculo previsto è stato di 100 µl. Presumibilmente, il maggior volume di inoculo ha comportato una maggior diluizione del plasmide a livello tissutale influenzando negativamente l'attivazione della risposta immunitaria. Le condizioni sperimentali relative alla somministrazione dei vaccini oggetto della presente tesi sono state identificate valutandone la riproducibilità in condizioni di campo. Un volume di inoculo eccessivamente ridotto risulta infatti di difficile manipolazione sia per il ridotto margine di errore nel momento della somministrazione sia per la ridotta disponibilità di dispositivi di iniezione capaci di lavorare con volumi così ridotti. La scelta di inoculare 100 µl di soluzione è stata inoltre basata sulla posologia di altri prodotti vaccinali commercialmente disponibili. Per quanto concerne la quantità di plasmide, nel corso di prove sperimentali di vaccinazione con un presidio contro IHN, Lapatra et al., (2000) ha riscontrato un'ottima protezione in trote iridee del peso di circa 120 grammi con dosi pari a 1 µg/pesce e 10 µg/pesce mentre somministrando 0,1 µg/pesce la protezione non è stata altrettanto soddisfacente. Diversamente, prove di vaccinazione in giovanili del peso di circa 3-4 grammi hanno evidenziato come, mentre una dose pari a 0,001 µg/pesce sia risultata appena sufficiente a ridurre in maniera significativa la mortalità rispetto al gruppo controllo, dosi pari a 0,01 µg/pesce e 0,1 µg/pesce abbiano indotto RPS pari al 78 e 97% rispettivamente (Lorenzen et al., 2000). Gli stessi autori hanno confrontato i risultati con

quelli ottenuti da Lapatra et al., (2000) in soggetti di taglia maggiore concludendo che presumibilmente la taglia dei pesci alla vaccinazione è in relazione negativa con la quantità di vaccino a DNA necessario per ottenere RPS elevate. Conseguentemente il volume di inoculo e la quantità di plasmide sono aspetti che devono essere ulteriormente approfonditi e che potenzialmente possono concorrere a migliorare ulteriormente la già buona protezione fornita dai vaccini in esame.

Per quanto concerne le analisi istologiche, i quadri riscontrati sono risultati sovrapponibili tra il gruppo controllo e i gruppi trattati con i plasmidi. La variabilità in termini di entità dei rilievi osservati è stata ricondotta alla diversa localizzazione della sezione rispetto al punto di inoculo. In nessun campione analizzato sono state riscontrate lesioni infiammatorie croniche o alterazioni morfologiche di tipo permanente, confermando la sicurezza dei prodotti vaccinali somministrati. Inoltre, non è stata riscontrata nessuna differenza morfologica significativa tra i campioni prelevati dal gruppo controllo e quelli derivanti dai gruppi trattati. La frammentazione delle fibre muscolari riscontrata nei campioni prelevati nelle prime 48h dalla vaccinazione, indipendentemente dal trattamento effettuato, è stata ricondotta al danno meccanico causato dalla penetrazione dell'ago. Nei campioni prelevati a timepoints successivi, sia nell'ambito del Safety Test che del Potency Test, le fibre muscolari non hanno evidenziato alcuna alterazione morfologica. La presenza di alcuni spot di lieve infiltrato infiammatorio mononucleato, riscontrato a 30 gg post vaccinazione solo nei campioni ottenuti dai gruppi trattati con i plasmidi, è presumibilmente causata dall'attivazione della risposta immunitaria indotta dai vaccini, risultato peraltro atteso. Considerato che i plasmidi possono persistere fino a 45 gg in trota iridea, questo reperto è stato quindi ritenuto normale. Un approccio immunoistochimico permetterebbe di evidenziare la glicoproteina espressa sulla superficie delle cellule presentanti l'antigene e di confermare questo aspetto. Tale analisi è prevista dal progetto ed è in fase di preparazione. L'assenza di segni di sofferenza o altre alterazioni comportamentali associata all'assenza di mortalità e alle ridotte lesioni istologiche riscontrate conferma la sicurezza dei vaccini a DNA per gli animali trattati.

Conclusioni

I vaccini a DNA utilizzati nel presente studio si sono rivelati estremamente efficaci nel ridurre le mortalità indotte dalle infezioni sostenute da VHS e IHN, in particolare alla dose di 1 µg/pesce. La loro somministrazione non ha comportato l'insorgenza di reazioni avverse, come appurato dall'assenza di segni clinici relativi a stato di sofferenza o malattia e dalla mancanza di lesioni istologiche nel punto di inoculo. Le analisi previste nell'ambito del progetto di ricerca corrente IZSVE RC 09/18 contribuiranno a meglio definire la risposta immunitaria indotta dai vaccini a DNA mediante la caratterizzazione del titolo anticorpale sui campioni di siero prelevati. Inoltre, la ricerca del plasmide nei campioni di muscolo ottenuti fino a 60 giorni dopo la vaccinazione permetterà di valutare la persistenza dello stesso negli animali trattati e fornirà indicazioni utili sia per confermare la sicurezza di tali presidi per il consumatore finale sia per la definizione di un tempo di sospensione idoneo. La fase successiva del progetto consisterà inoltre nella valutazione dell'efficacia dei vaccini a DNA in condizioni di campo, monitorando gli animali vaccinati con la dose più alta fino al termine del ciclo produttivo per determinare l'applicabilità della vaccinazione, le RPS indotte e l'impatto sulle produzioni nella realtà zootecnica nazionale.

Bibliografia

- Abbadi, M., Fusaro, A., Ceolin, C., Casarotto, C., Quartesan, R., Dalla Pozza, M., Cattoli G., Toffan A., Holmes E.C., Panzarin, V. (2016). Molecular evolution and phylogeography of co-circulating IHN and VHS in Italy. *Frontiers in Microbiology*, 7(AUG), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01306>
- Amend, D. F. (1975). Detection and transmission of infectious hematopoietic necrosis virus in rainbow trout. *Journal of Wildlife Diseases*, 11(4), 471–478. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-11.4.471>
- Baudin-Laurencin, F. (1987) IHN in France. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 7, 104.
- Bergmann, S. M., Fichtner, D., Skall, H. F., Schlotfeldt, H. J., & Olesen, N. J. (2003). Age- and weight-dependent susceptibility of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* to isolates of infectious haematopoietic necrosis virus (IHN) of varying virulence. *Diseases of Aquatic Organisms*, 55(3), 205–210. <https://doi.org/10.3354/dao055205>
- Bovo, G., Giorgetti, G., Jørgensen, R.E.V. and Nelson, N.J. (1987) Infectious hematopoietic necrosis: first detection in Italy. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 7, 124.
- Brudeseth, B. E., Castric, J., & Evensen, Ø. (2002). Studies on Pathogenesis Following Single and Double Infection with Viral Hemorrhagic Septicemia Virus and Infectious Hematopoietic Necrosis Virus in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Veterinary Pathology*, 39(2), 180–189. <https://doi.org/10.1354/vp.39-2-180>
- Brunson R, True K, Yancey J. VHS virus isolated at Makah National Fish Hatchery. *Fish Health Sect Am Fish Soc Newsl* 1989;17:3-4.
- Bruslé J., & Imbert C. (2002). *Biologie des poissons d'eau douce*. Londres Paris New York: Tec & Doc.
- Cieslak, M., Wahli, T., Diserens, N., Haenen, O. L. M., & Schütze, H. (2017). Phylogeny of the infectious hematopoietic necrosis virus in European aquaculture. *PLoS ONE*, 12(9), 4–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184490>
- Collins, C., Lorenzen, N., & Collet, B. (2019). DNA vaccination for finfish aquaculture. *Fish and Shellfish Immunology*, 85(July 2018), 106–125. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.07.012>
- Dixon, P., Paley, R., Alegria-Moran, R., & Oidtmann, B. (2016). Epidemiological characteristics of infectious hematopoietic necrosis virus (IHN): A review. *Veterinary Research*, 47(1), 1–26. <https://doi.org/10.1186/s13567-016-0341-1>
- Enzmann, P., Castric, J., Bovo, G., Thiery, R., Fichtner, D., Schütze, H., & Wahli, T. (2010). Evolution of infectious hematopoietic necrosis virus (IHN), a fish rhabdovirus , in Europe over 20 years : implications for control, 89, 9–15. <https://doi.org/10.3354/dao02182>
- FAO http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Oncorhynchus_mykiss/en
- FAO FishStatJ, v4.00.12, (2020). <http://www.fao.org/fishery/statistics/software/fishstatj/en>
- Forneris G., Paradisi S. & Specchi M. (1990). *Pesci d'acqua dolce*. Carlo Lorenzini Editore,

- Udine: 1-214.
- Fregeneda-Grandes, J. M., Skall, H. F., & Olesen, N. J. (2009). Antibody response of rainbow trout with single or double infections involving viral haemorrhagic septicaemia virus and infectious haematopoietic necrosis virus. *Diseases of Aquatic Organisms*, 83(1), 23–29. <https://doi.org/10.3354/dao01993>
- Fyhn, U.E.H., Clarke, W.C., Withler, R.E., 1991. Hemoglobins in smoltifying Chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha*, subjected to photoperiod control. *Aquaculture* 95 (3–4), 359–372.
- Glenting, J., & Wessels, S. (2005). Ensuring safety of DNA vaccines. *Microbial Cell Factories*, 4, 1–5. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-4-26>
- Gudding, R., Lillehaug, A., and Evensen, Ø (eds) (2014). *Fish Vaccination*. Cambridge, MA: Academic Press.
- Hopper K. The isolation of VHS from Chinook salmon at Glenwood Springs, Orcas Islands, Washington. *Fish Health Sect Am Fish Soc Newsl* 1989;17:1-2.
- Jensen, M. H. (1965). Research on the Virus of Egtved Disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 126(1), 422–426. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1965.tb14292.x>
- Jokumsen, A., & Svendsen, L.M., 2010. Farming of freshwater rainbow trout in Denmark. *DTU Aqua Rep.* 219, 1–47.
- Jonstrup, S. P., Kahns, S., Skall, H. F., Boutrup, T. S., & Olesen, N. J. (2013). Development and validation of a novel Taqman-based real-time RT-PCR assay suitable for demonstrating freedom from viral haemorrhagic septicaemia virus. *Journal of Fish Diseases*, 36(1), 9–23. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2012.01416.x>
- Keller, C. W., Fokken, C., Turville, S. G., Lünemann, A., Schmidt, J., Münz, C., & Lünemann, J. D. (2011). TNF- α induces macroautophagy and regulates MHC class II expression in human skeletal muscle cells. *Journal of Biological Chemistry*, 286(5), 3970–3980. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.159392>
- Kibenge, F., & Godoy, M. (2016). *Aquaculture virology*, 1st Ed. Elsevier Academic Press. ISBN: 9780128015735
- Kim, R., & Faisal, M. (2011). Emergence and resurgence of the viral hemorrhagic septicemia virus (Novirhabdovirus, Rhabdoviridae, Mononegavirales). *Journal of Advanced Research*, 2(1), 9–23. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2010.05.007>
- Kottelat M. & Freyhof J. (2007) *Handbook of European freshwater fishes*. Ed. Kottelat, Cornol, and Freyhof, Berlin: 1-646.
- Kurath, G., Garver, K. A., Corbeil, S., Elliott, D. G., Anderson, E. D., & Lapatra, S. E. (2006). Protective immunity and lack of histopathological damage two years after DNA vaccination against infectious hematopoietic necrosis virus in trout, 24, 345–354. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2005.07.068>
- Kurath, G., Garver, K. A., Troyer, R. M., Emmenegger, E. J., Einer-Jensen, K., & Anderson, E. D. (2003). Phylogeography of infectious haematopoietic necrosis virus in North America. *Journal of General Virology*, 84(4), 803–814. <https://doi.org/10.1099/vir.0.18771-0>
- Lapatra, S. E. (1998). Factors affecting pathogenicity of infectious hematopoietic necrosis

- virus (IHN) for salmonid fish. *Journal of Aquatic Animal Health*, 10(2), 121–131.
[https://doi.org/10.1577/1548-8667\(1998\)010<0121:FAPOIH>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8667(1998)010<0121:FAPOIH>2.0.CO;2)
- Lapatra, S. E., Corbeil, S., Jones, G. R., Shewmaker, W. D., & Kurath, G. (2000). Feature the dose-dependent effect on protection and humoral response to a dna vaccine against infectious hematopoietic necrosis (Ihn) virus in sub yearling rainbow trout. *Journal of Aquatic Animal Health*, 12(3), 167–180.
[https://doi.org/10.1577/1548-8667\(2000\)012<0181:FDDEOP>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8667(2000)012<0181:FDDEOP>2.0.CO;2)
- Lorenzen, E., Einer-Jensen, K., Martinussen, T., Lapatra, S. E., & Lorenzen, N. (2000). Feature dna vaccination of rainbow trout against viral hemorrhagic septicemia virus: A dose–response and time–course study. *Journal of Aquatic Animal Health*, 12(3), 167–180. [https://doi.org/10.1577/1548-8667\(2000\)012<0167:FVORTA>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8667(2000)012<0167:FVORTA>2.0.CO;2)
- OIE Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals, Access online, 2019.
https://www.oie.int/index.php?id=2439&L=0&htmfile=chapitre_ihn.htm
https://www.oie.int/index.php?id=2439&L=0&htmfile=chapitre_vhs.htm
- Olesen, N. J., Lorenzen, N., & Jørgensen, P.E.V. (1993). Serological differences among isolates of viral haemorrhagic septicaemia virus detected by neutralizing monoclonal and polyclonal antibodies. *Diseases of Aquatic Organisms*, 16, 163–170.
<https://doi.org/10.3354/dao016163>
- Overturf, K., LaPatra, S. E., & Powell, M. S. (2001). Real-time PCR for the detection and quantitative analysis of IHN in salmonids. *Journal of Fish Diseases*, 24(6), 325–333.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.2001.00296.x>
- Pastorino, P., & Prearo, M. (2016). I Salmonidi : sistematica , allevamento e patologie . (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum , 1792) First part – Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum , 1792). *Ittiopatologia*, (August 2016).
- Pennell W., & Barton B.A. (1992). Principles of salmonid culture. *Developments in Aquaculture and Fisheries Science*, 29. Elsevier Science 1996.
- Pooley, N. J., Tacchi, L., Secombes, C. J., & Martin, S. A. M. (2013). Inflammatory responses in primary muscle cell cultures in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *BMC Genomics*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-747>
- Purcell, M. K., Hart, S. A., Kurath, G., & Winton, J. R. (2006). Strand-specific, real-time RT-PCR assays for quantification of genomic and positive-sense RNAs of the fish rhabdovirus, Infectious hematopoietic necrosis virus. *Journal of Virological Methods*, 132(1–2), 18–24. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2005.08.017>
- Redding, L., & Weiner, D. B. (2009). DNA vaccines in veterinary use. *Expert Review of Vaccines*, 8(9), 1251–1276. <https://doi.org/10.1586/erv.09.77>
- Reyes, M., Ramírez, C., Ñancucheo, I., Villegas, R., Schaffeld, G., Krیمان, L., Gonzalez, J., & Oyarzun, P. (2017). A novel “in-feed” delivery platform applied for oral DNA vaccination against IPNV enables high protection in Atlantic salmon (*Salmon salar*). *Vaccine*, 35(4), 626–632. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.12.013>
- Roberts SD (1993) IHN at Lyons Ferry Hatchery: a case study of vertical transmission. *Fish Health Sect Am Fish Soc Newslett* 21:13–14
- Rucker, R.R., Whipple, W.J., Parvin, J.R. and Evans, C.A. (1953) A contagious disease of

- sockeye salmon possibly of virus origin. US Fish and Wildlife Service Fisheries Bulletin 54, 35–46.
- Sano, T., Nishimura, T., Okamoto, N., Yamazaki, T., Hanada, H., Watanabe, Y. (1977). Studies on Viral diseases of Japanese fish. VI. Infectious hematopoietic necrosis (IHN) of salmonids in the mainland of Japan. *J Tokyo Univ Fish* 63:81–85
- Schäperclaus W. Die Schädigungen der deutschen Fischerei durch Fischparasiten und Fischkrankheiten. *Allg Fischztg* 1938;41:267–70.
- Sepúlveda, D., Lorenzen, E., Rasmussen, J. S., Einer-Jensen, K., Collet, B., Secombes, C. J., & Lorenzen, N. (2019). Time-course study of the protection induced by an interferon-inducible DNA vaccine against viral haemorrhagic septicaemia in rainbow trout. *Fish and Shellfish Immunology*, 85(June 2018), 99–105. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.06.056>
- Shirota, H., Petrenko, L., Hong, C., & Klinman, D. M. (2007). Potential of Transfected Muscle Cells to Contribute to DNA Vaccine Immunogenicity. *The Journal of Immunology*, 179(1), 329–336. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.1.329>
- Simard, N. C. (2008). The Road to Licensure of a DNA Vaccine for Atlantic Salmon, 635–641.
- Thoulouze, M., Bouguyon, E., Carpentier, C., & Bre, M. (2004). Essential Role of the NV Protein of Novirhabdovirus for Pathogenicity in Rainbow Trout. *Journal of Virology*, 4098–4107. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.8.4098>
- Tonheim, T. C., Børgwald, J., & Dalmo, R. A. (2008). What happens to the DNA vaccine in fish? A review of current knowledge. *Fish and Shellfish Immunology*, 25(1–2), 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2008.03.007>
- Valero, Y., Awad, E., Buonocore, F., Arizcun, M., Esteban, M. Á., Meseguer, J., Chaves-Pozo, E., & Cuesta, A. (2016). An oral chitosan DNA vaccine against nodavirus improves transcription of cell-mediated cytotoxicity and interferon genes in the European sea bass juveniles gut and survival upon infection. *Developmental and Comparative Immunology*, 65, 64–72. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2016.06.021>
- Van Belle G., Fisher L.D., Heagerty P.J. & Lumley T. (2004) *Biostatistics: A Methodology for the Health Sciences*. John Wiley & Sons, Hoboken, NJ.
- Weidema, I. R. (2000). *Introduced species in the Nordic countries*. Copenhagen, DK: Nordic Council of Ministers. ISBN 9289304898
- Wingfield, W.H., Fryer, J.L. and Pilcher, K.S. (1969) Properties of the sockeye salmon virus (Oregon strain). *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 130, 1055–1059.
- Winton J.R. (1991). Recent advances in the detection and control of infectious hematopoietic necrosis virus (IHN) in aquaculture. *Ann. Rev. Fish Dis.*, 1, 83–93
- Woo, P. T. K., & Bruno, D. W. (2006). *Fish Diseases and Disorders, Volume 3: Viral, Bacterial and Fungal Infections*, 2nd Edition (Vol. 3).
- Yoshimizu, M., Sami, M., & Kimura, T., (1989) Survivability of infectious hematopoietic necrosis virus in fertilized eggs of masu and chum salmon. *J Aquat Anim Health* 1:13–20.