

Atti del
XXI Convegno Nazionale S.I.P.I.
Società Italiana Patologia Ittica

8-9 OTTOBRE 2015

AUDITORIUM COMUNALE S. NICOLO'
CHIOGGIA (VE)



Con la collaborazione di:



EVIDENZA ULTRAISTRUTTURALE E BIOMOLECOLARE DI ORGANISMI MIDICHLORIA-LIKE (MLO) IN TESSUTI DI TROTA IRIDEA E POSSIBILE RUOLO NELL'EZIOLOGIA DELLA RED MARK SYNDROME (RMS)

Galeotti M.^{1*}, Manzano M.¹, Cecchini F.¹, Volpatti D.¹, Bulfon C.¹, Beraldo P.¹, Rossi G.², Magi G.E.²

¹ Sezione di Patologia Veterinaria, Dipartimento di Scienze degli Alimenti, Università degli Studi di Udine; ² Scuola di Bioscienze e Medicina Veterinaria, Università di Camerino.

RMS e US SD sono malattie cutanee che colpiscono la trota iridea (*O. mykiss*) in molti paesi europei e negli Stati Uniti. L'eziologia di queste malattie è ancora incerta. A dispetto di indagini specifiche che individuano la presenza di DNA correlato a Rickettsia-like organisms (RLOs) in trote allevate negli Stati Uniti e in Europa (Lloyd *et al.*, 2008; Metselaar *et al.*, 2010), e più recentemente di DNA correlato a *Midichloria-like organism* (MLOs) in trote allevate in Scozia (Cafiso *et al.*, 2015), questi agenti patogeni non sono mai stati rilevati morfologicamente.

La presente ricerca rappresenta la prosecuzione di indagini condotte negli ultimi anni su focolai di RMS in Italia, finalizzate a comprendere la patogenesi e l'agente causale della malattia. A tal fine sono state campionate 17 trote con lesioni riferibili a RMS presso due allevamenti del nord Italia, con ricorrenti episodi di malattia, e 5 trote di controllo dallo stabulario ittico dell'Università di Udine, nel quale non sono mai stati segnalati episodi di RMS. Su campioni di cute e milza di tutti i soggetti sono state effettuate indagini istologiche, ultrastrutturali e biomolecolari. L'esame istologico ha evidenziato il tipico quadro di massiva infiltrazione linfocito-macrofagica coinvolgente tutti gli strati cutanei, talvolta fino al sottostante tessuto muscolare. L'indagine ultrastrutturale, effettuata con un microscopio elettronico Zeiss EM 109, ha evidenziato nel 59% dei soggetti la presenza di microrganismi ovali o allungati, di dimensioni di lunghezza pari a 400 -700 nm e di larghezza pari a 100-200 nm, con citoplasma granulare elettrondenso, parete trilaminare, con membrana esterna e interna, tipica dei batteri Gram-. Alcuni mostravano una struttura filamentosa, riferibile a DNA, disposta ad un polo del batterio. Nelle 5 trote di controllo non sono stati evidenziati microrganismi intracellulari. I batteri erano sempre intracellulari, localizzati in fibroblasti, eritrociti, macrofagi, raramente nei neutrofili. Previa estrazione del DNA, l'indagine biomolecolare è stata effettuata in due step: PCR con due primers messi a punto da Lloyd (RLO1 e RLO2), sull'amplificato è stata condotta una successiva PCR con due primers messi a punto dagli autori (RiFCfw e RiFCrev). Dopo la seconda amplificazione è stata ottenuta una banda di piccole dimensioni, molto definita, di 188 Kbp, evidenziata nella cute e nella milza del 76% delle trote. Nessuna delle 5 trote di controllo ha evidenziato la stessa positività. Le caratteristiche ultrastrutturali permettono di assimilare i microrganismi individuati quali appartenenti a Rickettsiales: in questo ordine le famiglie Rickettsiaceae e Midichloriaceae appaiono molto affini. Il confronto con la morfologia ultrastrutturale di altri batteri appartenenti alla famiglia Midichloriaceae (Fritsche *et al.*, 1999 ; Sacchi *et al.*, 2004; Sassera *et al.* 2006; Vannini *et al.*, 2010) individua una forte somiglianza tra questi batteri e quelli rinvenuti nella presente indagine. Inoltre i risultati dell'indagine biomolecolare supportano tale ipotesi in quanto i primers RiFCfw e RiFCrev, messi a punto nei nostri laboratori, sono in grado di riconoscere sia la sequenza del DNA 16s di Rickettsia-like organism, che la sequenza di DNA 16s di Midichloria-like organism. I risultati ultrastrutturali e biomolecolari, associati alla recente individuazione di positività per DNA correlato a MLO in trote affette da RMS in Scozia (Cafiso *et al.*, 2015), ci permettono di sostenere che i batteri intracellulari da noi rinvenuti in tessuti di trote affette da RMS in Italia, possano essere riferibili a Midichloria-like organisms, e che questi organismi possono essere ritenuti gli agenti causali di RMS.