

STUDIO ISTOLOGICO E IMMUNOISTOCIMICO SULLA REATTIVITÀ BRANCHIALE DEL BRANZINO (*DICENTRARCHUS LABRAX*) ALL'INFEZIONE DA *AMYLOODINIUM OCELLATUM*

Volpatti D.¹, Massimo M.¹, Bulfon C.¹, Beraldo P.¹, Zanolla S.¹, Byadgi O.¹, Ronza P.², Magi G.E.³, Galeotti M.¹

¹Dipartimento di Scienze AgroAlimentari, Ambientali e Animali (DI4A), Università di Udine; ² Dipartimento di Anatomia, Produzioni Animali e Scienze Cliniche Veterinarie, Università di Santiago de Compostela. Spagna; ³ Scuola di Bioscienze e Medicina Veterinaria, Università di Camerino.

Lo studio è stato finalizzato a localizzare e a descrivere le popolazioni cellulari che risultano reclutate e alcuni mediatori del processo infiammatorio che sono attivati in risposta all'infezione da *A. ocellatum* (AO) nel branzino (*D. labrax*), con particolare riferimento al tessuto branchiale. A tale proposito campioni di branchie sono stati prelevati nel corso di episodi di malattia spontanea e di malattia indotta sperimentalmente presso gli acquari della sezione di Scienze Animali e Veterinarie (DI4A) dell'Università di Udine. Il tessuto è stato immediatamente fissato in soluzione di Bouin e processato al fine di ottenere sezioni istologiche di 4 µm, poi colorate con E.E./PAS/Tricromica o alternativamente sottoposte a metodica immunohistochimica. Quest'ultima è stata realizzata mediante un sistema di rivelazione HRP anti-rabbit o anti -mouse (EnVision™ FLEX, Dako) e cromogeno DAB. La procedura ha previsto un preliminare smascheramento dell'antigene con High pH o Low pH solution (Dako) e l'uso di un pannello di anticorpi mono- e poli-clonali specifici per i seguenti antigeni: Ossido Nitrico Sintasi inducibile (iNOS) (RB-1605, Thermo Scientific); Citocromo P450 (CYP1A) (CO-226, Biosense Laboratories); GM-CSF Rα (sc-690, Santa Cruz Biotech); IgM di branzino (policlonale da coniglio, Univ. di Trieste); CD35 (N-19, sc-7640, Santa Cruz Biotech.); CD16 (H-80, sc-20627, Santa Cruz Biotech.); TNF-α (ab6671, Abcam); TLR4 (76B357, Imgenex), TLR2 (ab1655, Abcam). Questi marcatori sono stati selezionati sulla base della loro rilevanza quali indicatori di risposta infiammatoria e alla luce della loro comprovata reattività nei confronti dei tessuti del branzino. Le stesse analisi sono state condotte anche su campioni di branchie prelevati da soggetti di controllo sani.

Istologicamente è stato possibile osservare numerosi trofonti adesi alle lamelle secondarie, nonché l'evidente modificazione dell'architettura branchiale, caratterizzata soprattutto da iperplasia delle cellule epiteliali con conseguente fusione delle lamelle secondarie. In tale contesto l'immunomarcatura ha evidenziato che gli anticorpi per iNOS, GM-CSF Rα, TLR4, TLR2, CD16 identificano popolazioni cellulari riferibili a macrofagi, mentre l'anticorpo per TNF-α consente di immunolocalizzare i monociti circolanti e l'endotelio vasale. Diversamente la positività per CYP1A riguarda le cellule epiteliali, piuttosto che le cellule simil-macrofagiche. L'anticorpo policlonale per le IgM ha marcato le plasmacellule e talvolta alcune cellule assimilabili a macrofagi. TNF-α e iNOS hanno marcato anche il parassita (in particolare i trofonti allo stadio precoce di adesione), saranno perciò necessari alcuni approfondimenti per analizzare le ragioni di tale reattività. In merito alla reattività dell'ospite i nostri risultati preliminari suggeriscono che nel tessuto branchiale la risposta innata inizia tramite il coinvolgimento di cellule simil-macrofagiche positive per i PRRs, ovvero i pattern recognition receptors TLR4 and TLR2. Esse sono prevalentemente localizzate nelle porzioni infiammate e iperplastiche delle branchie parassitate. Si ritiene che AO, similmente ad altri protozoi, possa stimolare la risposta immunitaria attraverso l'attivazione dei TLRs e la conseguente produzione di citochine e altri mediatori dell'infiammazione quali la forma inducibile della NO sintasi, evidenziata nell'epitelio branchiale mediante marcatura con l'anticorpo specifico.

The study was conducted within the framework of ParaFishControl, a EU H2020-funded project (634429) aimed at increasing sustainability and competitiveness of the aquaculture industry by controlling and mitigating parasitic species affecting the main European farmed fish species.