

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA
Corso di Laurea magistrale in Biologia marina



TESI DI LAUREA

Episodio di mortalità e decorso della malattia da Acipenser iridovirus European (AcIV-E) in storioni russi (Acipenser gueldenstaedtii) allevati a Goito.

Relatore: Prof. FRANCESCO QUAGLIO

Dipartimento di Biomedicina comparata e alimentazione (BCA), Agripolis, Legnaro PD

Correlatori:

dott.ssa GINEVRA BROCCA

Dipartimento di Biomedicina comparata e alimentazione (BCA), Agripolis, Legnaro PD;

dott.ssa ANNA TOFFAN

Laboratorio di Referenza Nazionale per le malattie dei pesci, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSVe), Legnaro, PD

Laureando: Francesco Paoli

ANNO ACCADEMICO 2021/2022

INDICE

PARTE INTRODUTTIVA	4
1.Riassunto	4
2. Introduzione	4
2.1 Acipenseridae (classificazione, distribuzione, morfologia, ciclo vitale)	4
2.2 Popolazioni naturali e acquacoltura	7
2.3 Dati di produzione e mercato	9
2.4 Patologie.....	11
2.4.1 Malattie batteriche.....	11
2.4.1.1 Batteri Gram negativi.....	12
2.4.1.2 Batteri Gram positivi.....	16
2.4.2 Parassiti	19
2.4.2.1 Protozoi	19
2.4.2.2 Metazoi.....	21
2.4.3 Funghi	26
2.4.4 Malattie virali.....	27
2.4.4.1 Alloherpesviridae	27
2.4.4.2 Adenoviridae.....	29
2.4.4.3 Malattie virali minori	29
2.4.4.4 Virus Nucleocitoplasmatici a grande DNA dello storione (sNCLDV).....	30
PARTE SPERIMENTALE	35
2.5 Caso di studio.....	35
2.6 obiettivo dello studio.....	35
2.7 Organizzazione e caratteristiche delle vasche.....	36
3. Materiali e metodi	39
3.1 Campionamento	39
3.1.1 Campionamento per istologia:	39
3.1.2 Campionamento per ricerca virale	39
3.1.3 Campionamento ambientale per rilevare DNA di AcIV-E all'interno del mezzo acquoso	40
3.1.4 Campionamento ambientale per rilevare DNA di AcIV-E nel muco	40
3.1.5 Campionamento per esami batteriologici.....	40
3.2 Realizzazione di preparati istologici	41
3.3 Rilevazione del DNA di AcIV-E	42

3.3.2 Filtraggio dei campioni di Acqua.....	42
3.3.3 Centrifugazione e concentrazione dei campioni di muco	43
3.3.4. Microscopia elettronica a trasmissione	43
3.3.5 Real Time PCR per la rilevazione del DNA di AcIV-E	43
3.3.6 Sequenziamento e analisi filogenetica	45
3.4 Esecuzione di esami batteriologici.....	46
4. Risultati.....	47
4.1-Segni clinici	47
4.2 Mortalità nel tempo di av.2	49
4.3 -Risultati istologici.....	54
4.4 Risultato della real time PCR per la rilevazione del DNA di AcIV-E.....	57
4.5 Risultato del campionamento ambientale per rilevare DNA di AcIV-E all'interno del mezzo acquoso.....	59
4.6- Microscopia elettronica a trasmissione.....	59
4.7 Esami batteriologici	60
4.8 Analisi filogenetica	61
5. Discussione.....	63
6. Conclusione.....	67
7. Bibliografia	67

PARTE INTRODUTTIVA

1. Riassunto

La storionicoltura è un'attività commerciale importante in molti paesi del mondo per quanto riguarda la produzione di caviale e il ripopolamento di specie autoctone di acipenseridi, molte delle quali sono considerate vulnerabili o a rischio critico di estinzione. Quasi tutte le specie di acipenseridi sono anadrome o anfidrome. L'allevamento degli storioni in Italia e in Europa è un'attività prevalentemente praticata in acqua dolce, in impianti a terra.

Uno dei problemi più rilevanti che si pongono nel momento in cui si allevano queste specie di pesci sono le patologie, soprattutto quelle ad eziologia virale. La prevenzione delle infezioni di questi virus è cruciale perché ad oggi non esistono vaccini stabulogeni o trattamenti efficaci che ne impediscano la diffusione. È stata svolta un'indagine sanitaria da luglio 2021 a febbraio 2022 in un allevamento nel mantovano che riportava annualmente mortalità di giovanili di *Acipenser gueldenstaedtii*. Sono stati effettuati esami istologici, batteriologici e virologici partendo da campioni di animali sani e sintomatici e da matrici ambientali. La mortalità cumulativa osservata è stata pari al 15,9%. La sintomatologia clinica si è risolta in due mesi dall'inizio dell'episodio di malattia. I risultati delle analisi di laboratorio identificano AcIV-E come agente responsabile di malattia.

2. Introduzione

2.1 Acipenseridae (classificazione, distribuzione, morfologia, ciclo vitale)

“Storione” è il nome comune con cui si definiscono le 26 specie appartenenti alla superclasse degli osteitti, classe degli attinopterigi, sottoclasse dei condrostei, ordine Acipenseriformes e alla famiglia Acipenseridae, che si divide in 4 generi: *Acipenser*, *Huso*, *Scaphirhynchus* e *Pseudoscaphirhynchus*. La maggior parte delle specie sono distribuite nell'emisfero nord del pianeta; più del 50% in Europa, prevalentemente nella regione Ponto-Caspica (Mar Nero, Mar Caspio e Mar d'Azov), più del 25% in Nord America e le restanti specie in Asia orientale e in Siberia (figura 1). Esistono specie che si riproducono in acqua dolce risalendo il corso dei fiumi, a cui segue la migrazione della prole in mare aperto (specie anadrome, *Acipenser sturio*, *Acipenser transmontanus*, *Acipenser oxyrinchus*) o in acque salmastre (Mar Caspio, Mare d'Azov, Mar Nero e Mar Baltico) meno lontane dai siti di riproduzione (specie semi anadrome, *Acipenser gueldenstaedtii*, *Acipenser stellatus* e *Huso huso*).

Alcune specie, tuttavia, si sono adattate esclusivamente all'acqua dolce (*A. fluvescens*). Alcune popolazioni anadrome e semi anadrome hanno potuto adattarsi a svolgere il loro completo ciclo riproduttivo in acqua dolce. Molte specie Ponto-Caspiche, sono capaci di sopravvivere e crescere in cattività in sistemi alimentati da acqua dolce (Billard & Lecointre, 2000).

La morfologia generale degli storioni (figura 2) è caratterizzata da: corporatura allungata, ventre appiattito, rostro, scheletro cartilagineo, branchie ricoperte da un'espansione dell'osso subopercolare, apparato boccale con disco orale protrattile, pinna caudale eterocerca, placche ossee dermiche disposte esteriormente in 5 file (il numero e la disposizione di tali placche ossee costituisce uno dei criteri di riconoscimento e classificazione delle varie specie). Anteriormente alla bocca si rinvergono quattro barbigli con funzione tattile, la cui posizione, associata alla forma del muso, costituisce un ulteriore carattere di classificazione (Della Rosa *et al.*, 1992).

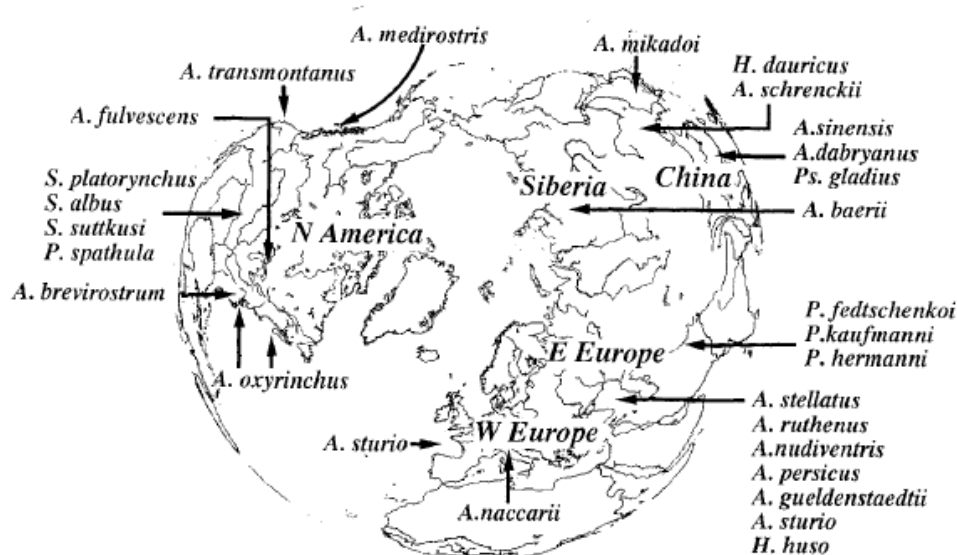


Figura 1: distribuzione geografica delle specie di storioni (Billard & Lecointre, 2000).

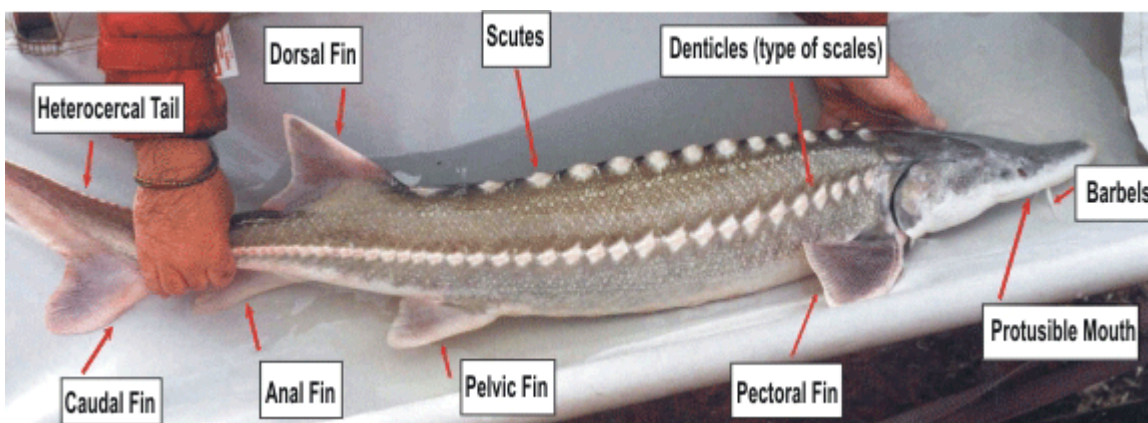


Figura 2: caratteristiche morfologiche degli acipenseridi.

Gli acipenseriformi sono pesci tendenzialmente longevi e di grandi dimensioni.

Alcune specie, come ad esempio lo storione Ladano (*Huso huso*), possono vivere fino a 100 anni e superare i 1000 kg di peso. La longevità è correlata alla maturità sessuale tardiva che varia molto tra le specie e che generalmente avviene tra i 6 e i 20 anni di età, con i maschi che tendono a maturare leggermente prima delle femmine.

Gli storioni maturi non si riproducono annualmente, bensì gli eventi riproduttivi di un singolo individuo possono avvenire una volta ogni 2-11 anni per le femmine e una volta ogni 1-6 anni per i maschi. Lo sforzo riproduttivo per ogni evento è importante, come mostrato dagli indici gonadosomatici (GSI) che raggiungono dal 3% al 9% nei maschi e dal 11% al 25% nelle femmine (Tabella1). L'indice gonadosomatico è espresso come il rapporto tra il peso delle gonadi e il peso totale dell'organismo). La fecondità espressa dal numero di follicoli ovarici precedenti all'ovulazione, dipende dalle dimensioni delle uova, per esempio 6.000-7.000 per kg di peso corporeo della femmina in *Huso huso* e 30.000 in *Acipenser ruthenus* (Holcick,1989). Molte specie si riproducono nel periodo dell'anno compreso tra la primavera e l'inizio dell'estate in un ampio range di temperatura dell'acqua (6°C-25°C), in avvallamenti formati dal corso del fiume, su substrato duro e ghiaioso. Per molte specie, l'insieme dei fattori, che stimola la riproduzione (temperatura, intensità di flusso di corrente, tipologia del substrato, ruolo dei feromoni), rimane sconosciuto.

In base alla temperatura dell'acqua la schiusa delle uova avviene dopo 200-250 ore. Le larve alla schiusa variano dai 6 ai 15 mm, sono pelagiche e gradualmente vengono trasportate a valle dalla corrente del fiume verso zone meno turbolente, tendono a rifugiarsi negli interstizi tra i ciottoli del fondo, fino al completo riassorbimento del sacco vitellino, a cui segue l'alimentazione esogena. La dieta iniziale è a base di zooplancton. Al completamento della metamorfosi dalla forma larvale a quella giovanile, inizia una dieta bentonica che si basa di oligocheti e chironomidi (Hochleithner & Gessner, 2012). Successivamente, lo spettro alimentare si differenzia a seconda delle specie e dell'età degli individui; la dieta degli storioni può includere oligocheti, larve d'insetti, crostacei, molluschi e piccoli pesci. Solitamente, i giovanili delle specie anadrome migrano al mare già durante la loro prima estate (Kottelat & Freyhof, 2007).

Species	River	GSI %		Fecundity eggs/kg × 1000	Size of ova	
		male	female		mm	mg
<i>Acipenser sturio</i>	Gironde		13.0-30.0	18.0-23.0	2.4-2.8	
<i>Huso dauricus</i>	Yangtze		14.0	3.2-15	2.5-3.5	
<i>Huso huso</i>	Volga	3.0-9.0	13.0-17.0	3.3	3.3-4.0	29.5
<i>A. nudiventris</i>	Kura, Aral Sea		11.0-23.0	9.1-21.7	1.5-3.0	12.0-15.0
<i>A. sinensis</i>	Yangtze				3.7-4.9	
<i>A. gueldenstaedtii</i>	Volga, Ural	3.9-5.5	15.0	10.8-14.8	2.8×3.2*	20.6-22.1
<i>A. stellatus</i>	Volga	5.8	25.9		2.0-3.0	8.0-9.0
<i>A. persicus</i>	Kura, Volga, Ural	6.5	20.9		3.2-3.8	
<i>Polyodon spathula</i>	Mississippi			9.1-2.6	2.0-3.1	3.7
<i>A. brevirostrum</i>	Hudson				3.0-3.2	
<i>A. fulvescens</i>	St. Lawrence				2.7-3.5	
<i>A. medirostris</i>	Sacramento, Rogue	5.7		3.0-6.0	3.2-3.7	
<i>A. ruthenus</i>	Danube				1.8×2-2.8×2.9*	
<i>A. baerii</i>	Ob, Lenisei, Lena	3.9-9.1	24.0	13.6-16.5	2.4-4.9	10.8-25.0
<i>A. naccarii</i>	Pô				2.0-2.4	
<i>A. oxyrinchus</i>	St. Lawrence		25	16	2.1-3.0	
<i>A. transmontanus</i>	Columbia, Fraser				3.5-4.0	

*ovoid eggs.

Tabella 1: dimensione delle gonadi come percentuale del peso corporeo (GSI), fecondità in migliaia di uova per kg di peso corporeo e dimensioni delle uova (Billard & Lecointre, 2000).

2.2 Popolazioni naturali e acquacoltura

Gli storioni, specialmente le specie commerciali del Mar Nero e del Mar Caspio, hanno subito un drastico declino in particolare dagli anni '90 del secolo scorso in poi, in seguito a: pesca non sostenibile (legale e illegale), alterazione dell'habitat (interruzione del corso dei fiumi con costruzione di dighe), deterioramento della qualità dell'acqua (eutrofizzazione, ecc.). Nel 1998 il CITES (convenzione sul commercio internazionale delle specie minacciate di estinzione) inserisce tutte le specie di acipenseriformi (storioni e pesci spatola) nella lista delle specie sottoposte a tutela. Sono state istituite numerose misure di protezione regolamentate dalla CITES come ad esempio: regolamentazione della pesca, recupero degli habitat, immissione di giovanili ed elenchi di tutti i prodotti derivati dagli storioni compreso il caviale (Billard & Lecointre, 2000). Malgrado l'incremento negli sforzi di conservazione delle specie, il declino non si è arrestato. Gli storioni rivestono una notevole importanza dal punto di vista economico per la pregevolezza delle loro carni e per le loro uova che, opportunamente salate, costituiscono il caviale.

La storionicoltura ha avuto inizio in Italia nel 1977 per ripopolamento con storioni cobice autoctoni (*Acipenser naccarii*) catturati nel bacino del Po. Successivamente, sono stati importati dagli Stati Uniti lo storione bianco del Pacifico (*Acipenser transmontanus*), e dalla Russia lo storione siberiano (*Acipenser baerii*), lo storione russo o Danubiano (*Acipenser gueldenstaedtii*) e lo storione Ladano (*Huso huso*) che ancor oggi, insieme al più recente sterleto (*Acipenser ruthenus*) e agli ibridi (*A. ruthenus* x *Huso huso*, *A. naccarii* x *A. gueldenstaedtii*, *A. gueldenstaedtii* x *Huso huso*, *A.*

gueldenstaedtii x baerii, *A. naccarii x baerii*, *A. naccarii x Huso huso*, *Huso dauricus x A. schrenckii*), rappresentano le principali specie allevate in Italia. La produzione nazionale di Acipenseridi è attualmente attestata attorno alle 1.000 tonnellate annue (A.P.I., 2019). La storionicoltura in Italia è nata come allevamento sostitutivo in impianti in origine destinati ad altre specie ittiche (Anguilla, trota, pesce gatto, ecc.). La riproduzione dello storione italiano è possibile dal 1988 con metodo incruento tramite stimolazione ormonale con l'analogo sintetico Des Gly 10 [D-Ala 6] LH-RH etilamide a bassissimo dosaggio su riproduttori selvatici mantenuti in cattività. Lo svezzamento è possibile a diverse temperature, da 15°C a 24°C, e viene effettuato di regola in vasche in vetroresina in avannotteria (truogoli, vasche quadrate, ecc., capacità 200-400 l) ad elevato ricambio, con densità iniziale di 1-2 kg/m³; l'alimentazione è costituita inizialmente (1-2 settimane) da nauplii di *Artemia salina* e/o Cladoceri, progressivamente sostituiti da mangime commerciale per postlarve di specie pregiate. La tipologia di allevamento degli acipenseridi è tendenzialmente di tipo intensivo a terra (in cui si controllano riproduzione e alimentazione degli individui). Benché tutte prediligano temperature di 18-24°C, le diverse specie differiscono tra loro per velocità di accrescimento, comportamento ed adattabilità alle condizioni di allevamento intensivo (Arlati & Bronzi, 2001). La storionicoltura consta di diverse tecnologie di allevamento. La più comune sono i sistemi "flow-through" (FT) in cui l'acqua di un fiume o di un fontanile viene prelevata a monte dell'allevamento tramite una pompa, passa poi all'interno delle vasche in cui si accrescono gli storioni e infine viene restituita a valle. Questo tipo di tecnologia è utilizzata per il 36%, seguita da sistemi di acquacoltura a ricircolo (RAS) (21%), gabbie galleggianti (18%), tecnologie miste RAS/FT (11%) e stagni (6%) (Bronzi et al., 2017).

Le esperienze di allevamento di storione italiano sono condotte soprattutto in raceways da troiticoltura delle dimensioni di 200x5 m, suddivisi in settori successivi, ad una densità media di 18 kg/m², con 7-8 ricambi/giorno di acqua di fontanile, a 12-18°C e ben ossigenata (ossigeno disciolto 7 mg/l, pH 7,35). Lo storione americano è allevato per l'ingrasso soprattutto in grandi vasche in terra da 2.000-2.400 m² inizialmente usate per anguille, con una densità media di 6-7 kg/m², 2-3 ricambi/giorno e temperatura di 15-23°C. Lo storione siberiano (*A. baerii*) e lo storione russo (*A. gueldenstaedtii*) sono allevati per l'ingrasso soprattutto in vasche in vetroresina dalle dimensioni modeste (circa 25 m²) o in cemento (60 m²) con densità media di 25-30 kg/m², 20-25 ricambi giornalieri a seconda della temperatura dell'acqua (14-23°C). Ultimamente vengono anche allevati in stagni, dove però si ha una densità più modesta (3-4 kg/m³) anche per lo scarso ricambio idrico (1 ogni 2-3 gg.). Sono state condotte con buoni risultati anche esperienze di allevamento in gabbie galleggianti in bacini artificiali di acqua dolce, ed esperienze con diverse specie (storione italiano, storione siberiano e ibrido russo) di allevamento in sistemi a ricircolazione in vasche in vetroresina o in telo plastico con densità medie di circa 50 kg/m², 1 ricambio/ora di acqua a 23±2°C (ossigeno disciolto di 7 mg/l; pH 7,4) (Arlati & Bronzi, 2001). Lo storione russo (*A. gueldenstaedtii*) è stato importato in Italia per la prima volta dall'Ungheria nel 1991 e successivamente dalla Russia a scopo sperimentale. I primi dati di allevamento hanno fornito dati contrastanti sull'adattabilità e sull'accrescimento di questa specie, che resta però una delle specie classiche per la produzione del caviale ("osetra"). Alcuni allevamenti dispongono di particolari aree dedicate (avannotterie) nelle quali, previa riproduzione artificiale, avviene la schiusa delle uova e lo svezzamento delle larve, nonché a volte l'accrescimento dei giovanili. Talvolta nelle avannotterie è presente un sistema di regolazione termica che permette di mantenere temperature standard dell'acqua in ingresso, ideali

per la schiusa delle uova oppure per l'accrescimento delle larve (16-20 °C). Dopo la schiusa in incubatoio a flusso forzato, le pre-larve neonate, munite di sacco vitellino vengono trasferite in vasche in vetroresina. Al riassorbimento del sacco vitellino, viene somministrata alimentazione esogena, nelle prime fasi alimento naturale (naupli di *Artemia salina*, rotiferi) per poi gradualmente passare all'alimentazione artificiale con mangime (più conveniente per l'allevatore a livello di costi/benefici). Ultimato lo svezzamento i giovanili vengono cresciuti in vasche in terra o in cemento (pre-ingrasso e ingrasso) fino al raggiungimento della taglia commerciale. La produzione può essere finalizzata per: caviale, carne, vendita di novellame, ripopolamento, pesca sportiva.

2.3 Dati di produzione e mercato

Bronzi et al. (2019) hanno riportato dati sulla produzione globale di storione. Il rapporto è stato redatto analizzando le risposte agli 86 questionari indirizzati a esperti del settore (allevatori e ricercatori), in 46 diversi paesi. La biomassa degli storioni allevati ha raggiunto un picco nel 2015 di 129.608 tonnellate (t) (grafico 1).

La produzione mondiale di caviale è aumentata negli ultimi anni e la produzione del 2017 ammontava approssimativamente a 364 t. La Cina ha contribuito alla produzione totale con più di 100 t, seguita dalla Russia (49 t) dall'Italia (43 t) e diversi altri paesi (grafico 2).

Come si può notare nel grafico 3, il caviale negli anni '80 era prodotto in grandi quantità (circa 3500 t) da storioni selvatici. La progressiva diminuzione della produzione di caviale fino ai primi anni 2000 è stata la conseguenza della quasi totale scomparsa delle popolazioni in ambienti naturali di storione. Per far fronte alla domanda di caviale si è fatto ricorso all'allevamento, a sostituzione del prodotto naturale, con produzioni nettamente inferiori agli anni '80. Per quanto riguarda il mercato della carne di storione, ad esclusione di Cina, Russia e Iran, non vi è apprezzamento da parte dei consumatori di altre aree del mondo e di molti paesi europei (il consumatore medio non è solito consumare carne di storione). I trend della produzione degli ultimi 5 anni e le previsioni per il futuro suggeriscono uno scenario a breve termine in cui la domanda di carne rimane e rimarrà minore dell'offerta, perciò il mercato dovrà espandersi, focalizzandosi su nuove aree di mercato.

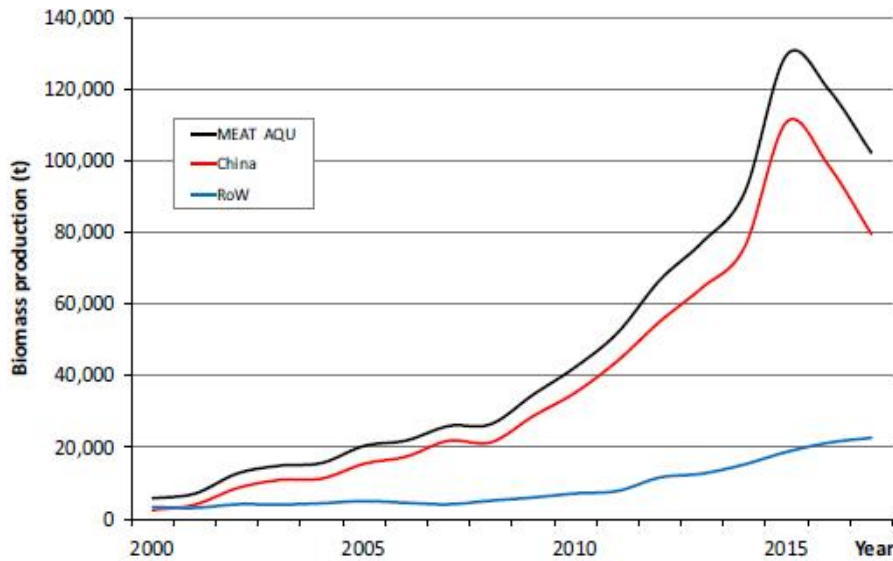


Grafico 1: la linea nera mostra i trend nella produzione globale di storione allevato in termini di biomassa (t) tra il 2000 e il 2017. La linea rossa rappresenta la produzione cinese mentre la linea blu rappresenta la produzione del resto del mondo (Bronzi et al., 2019).

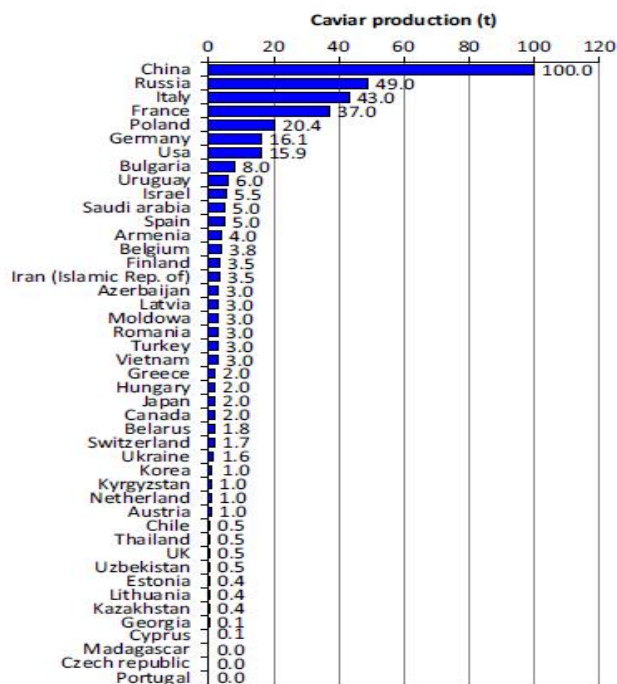


Grafico 2: stima della produzione di caviale legale proveniente da acquacoltura per paese in tonnellate (t) relativa al 2017 (Bronzi et al., 2019).

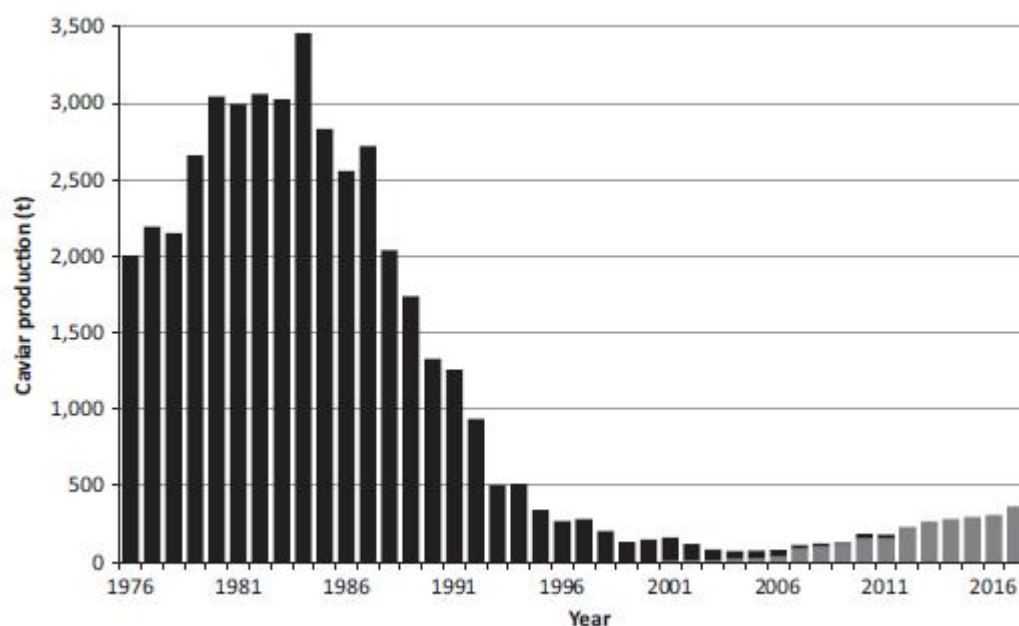


Grafico 3: produzione di caviale mondiale proveniente da stock naturali tra il 1976 e il 2011 secondo i dati statistici della FAO (in nero), e le stime (in grigio) di produzione di caviale da acquacoltura provenienti da varie fonti (1991-2017) (Bronzi et al., 2019).

2.4 Patologie

Lo sviluppo dell'allevamento degli storioni, comporta la possibilità di emergenza e rapida diffusione di molti agenti eziologici di infezione, rappresentando un serio problema per le aziende del settore. Numerose patologie virali, batteriche, fungine e parassitarie sono state segnalate in tutto il mondo nelle storionicolture. A causa delle conoscenze limitate a proposito dell'epidemiologia e dei metodi di controllo, le malattie infettive rappresentano ancora una grande sfida nell'acquacoltura degli storioni. Ciò premesso, nessuna delle malattie segnalate nelle specie di acipenseridi è regolata da decreti legislativi dell'UE o dall'Organizzazione mondiale della salute animale (OIE) (Radosavljevic et al., 2019). L'allevamento intensivo infatti espone i pesci a fenomeni di stress (elevate densità e manipolazioni in vasca, selezioni, inadeguati parametri chimico-fisici dell'acqua, ecc.) che predispongono i soggetti a malattie infettive virali o batteriche (Georgiadis et al., 2000).

2.4.1 Malattie batteriche

Per quanto riguarda le malattie ad eziologia batterica, la maggior parte dei batteri isolati in allevamenti di storioni, sono microorganismi ubiquitari, che agiscono da opportunisti sviluppando malattia in condizioni a loro favorevoli. Sono stati segnalati diversi agenti eziologici di batteriosi in diversi contesti di allevamento.

2.4.1.1 Batteri Gram negativi

Mixobatteriosi

Sono segnalate in letteratura flavobatteriosi da *Flavobacterium johnsoniae* (Karatas et al., 2010) e la malattia colonnare da *Flavobacterium columnare* (Hedrick et al., 2001). *Flavobacterium johnsoniae* è stato isolato in allevamenti in Russia da giovanili di storioni (3-4 g) (Bauer et al., 2002). *Flavobacterium johnsoniae* e di *Flavobacterium hydatis* sono stati associati ad episodi di malattia in storioni russi (*Acipenser gueldenstaedtii*) di 6 -7 anni di età allevati in Turchia (Karatas et al., 2010, Timur et al., 2010). Due focolai si sono verificati nell'autunno del 2007 e del 2008 dopo forti piogge accompagnate da un improvviso cambiamento della temperatura dell'acqua e da un aumento dei solidi sospesi. Gli storioni mostravano ulcerazioni, emorragie ed erosioni cutanee superficiali soprattutto sul lato ventrale comprese le pinne pettorali e pelviche come riportato in altri studi. I pesci colpiti erano letargici e mostravano un'eccessiva secrezione di muco con lesioni cutanee che apparivano come macchie grigio chiaro. *Flavobacterium columnare* è stato segnalato anche in *Acipenser transmontanus* (Hedrick et al., 2001).



Figura 3: Lesioni da *Flavobacterium columnare* in branchie di storione siberiano (*A.baerii*) (www.genoscope.cns.fr)

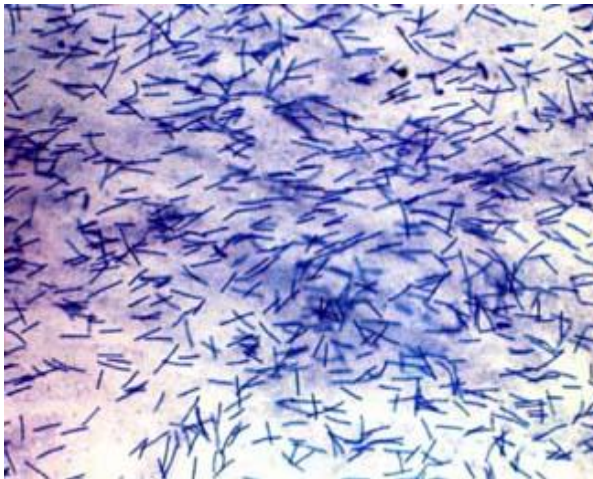


Figura 4: *Flavobacterium columnare* (striscio a fresco colorato con blue di metilene) (www.vet.uga.edu)

Aeromoniasi

L'infezione da *Aeromonas* motile (MAI) è una delle infezioni più comuni nello storione (Santi et al., 2019). La MAI è la più frequente infezione batterica dello storione ed è spesso associata a malattie virali. Le specie mobili di *Aeromonas* sono state generalmente isolate dallo storione in associazione a stress e densità elevate. *Aeromonas hydrophila* è stato isolato da Quaglio et al. (2000) nel giugno 1998 in sterleti (*Acipenser ruthenus*) del peso medio di 1 grammo, prodotti in un allevamento intensivo in provincia di Modena, causando grave mortalità (30%) nell'arco di 30 ore. All'esame clinico si osservava: stato di dimagrimento, atassia natatoria, ed assenza di fuga alla stimolazione. L'esame necroscopico presentava: anemia branchiale, ascite, arrossamenti peribuccali, perianali e alla base delle pinne, aumento di volume della milza e del fegato con colorito pallido. All'esame istologico si rilevava: enterite catarrale, sofferenza dei tubuli renali ipertrofia e

iperplasia delle cellule caliciformi dell'epidermide, necrosi muscolare, epatite sierosa con dilatazione dei sinusoidi. Setticemia da *Aeromonas* mobile causata da *Aeromonas hydrophila* è stata segnalata con notevoli perdite in storione persiano (*Acipenser persicus*) nell'Iran settentrionale (Soltani & Kalbassi, 2001) e anche nello storione bianco (*Acipenser transmontanus*) del fiume Harrison in Canada (Raverty & Nikl, 1999) ed in storione siberiano (*A.baerii*) in nord Italia (Colussi et al., 2005). *Aeromonas hydrophila* come agente patogeno è stato isolato anche da storione dell'Amur (*Acipenser schrenckii*) in Cina (Meng et al., 2011). Infezioni da *Aeromonas hydrophila* e *Aeromonas veronii* sono state riscontrate in allevamenti in Cina di storione cinese (*Acipenser sinensis*) durante un'epidemia di una malattia caratterizzata da ascite emorragica, con emorragie intestinali e renali (Di et al., 2018). In Turchia, episodi di malattia da *Aeromonas hydrophila* sono stati descritti nello storione russo (*Acipenser gueldenstaedtii*) con setticemia emorragica batterica e alto tasso di mortalità (Timur et al., 2010; Ture et al., 2018). *Aeromonas veronii* è stato identificato come agente patogeno e causa di mortalità dello storione siberiano (*Acipenser baerii*) (Ma et al., 2009). *Aeromonas veronii* è stato isolato da storione beluga e storione stellato allevati in Iran in associazione a *Cryseobacterium joostei* (Gholamhosseini et al., 2018). *Aeromonas sobria* è stato isolato da *Acipenser gueldenstaedtii* e *Acipenser baerii* in Turchia (Kayis et al., 2017).



Figura 5: Fegato emorragico in presenza di *Aeromonas hydrophila* (www.fisheries.com).

Yersiniosi

Yersinia ruckeri è stata ritenuta responsabile del 10% di mortalità in coltura in storione siberiano (*Acipenser baerii*) in Francia (Vuillaume et al., 1987). *Yersinia ruckeri*, *Flavobacterium columnare*, *Flavobacterium psychrophilum* e *Renibacterium salmoninarum* sono stati isolati da storioni allevati in sistema di acquacoltura a ricircolo in Finlandia (Pelkola et al., 2012).

Pseudomoniasi

Un focolaio di *Pseudomonas fluorescens* è stato segnalato in giovanili (10 g in taglia) di storione siberiano (*Acipenser baerii*) con elevata mortalità (40%) allevati in nord Italia (Brunetti et al., 2006). Zaharia & Dumitrescu (2011) hanno isolato in Romania *Aeromonas* e *Pseudomonas* in storione beluga (*Huso huso*) e storione russo (*Acipenser gueldenstaedtii*) allevati in acqua dolce affetti da una setticemia emorragica. Kays et al (2017) da *Acipenser gueldenstaedtii* e *Acipenser baerii* in Turchia hanno isolato: *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas sobria*, *Aeromonas salmonicida*, *Acinetobacter radioresistens*, *Bacillus mycoides*, *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida* e *Serratia sp.*

Vibriosi

Il più comune agente batterico patogeno che colpisce storione beluga e storione russo allevati in ambiente marino è *Vibrio anguillarum* (Austin & Austin, 2007). Gli autori di questo studio associano *Vibrio anguillarum* a emorragie intestinali e peritoneali.

Zaharia & Dumitrescu (2011) hanno isolato in Romania *Vibrio anguillarum* e *vibrio sp.* in storione beluga e storione russo, allevati in gabbie galleggianti nel Mar Nero, affetti da una setticemia emorragica. Altri studi riportano che *Vibrio alginolyticus* e *pasteurella sp.* causano mortalità in *Acipenser baerii* (Costinar et al., 2010).

Epiteliocisti

L'epiteliocisti è una comune malattia dei teleostei provocata da batteri appartenenti al phylum *chlamydia*, genere di batteri Gram negativi, patogeni intracellulari obbligati. Groff et al. (1996) hanno descritto negli USA un caso di epiteliocisti con lesioni da lievi a moderate in *A. transmontanus* di 11 mesi di vita (250-300 g) con una mortalità del 4-8%. All'esame istologico le cellule dell'epitelio branchiale delle lamelle si presentavano ipertrofiche in modo variabile con profili da sferici a ovali distribuite casualmente. Le cellule infette contenevano microorganismi da coccoidi a coccobacillari (inclusioni intracitoplasmatiche) che apparivano come materiale granulazione fine omogeneo denso e basofilo.

2.4.1.2 Batteri Gram positivi

Streptococcosi

Streptococcus iniae è emerso negli ultimi decenni come un importante patogeno per i pesci, causando elevate perdite negli allevamenti di acquacoltura in tutto il mondo. È stato documentato che almeno 27 specie di pesci sono sensibili a *S. iniae*, comprendenti sia specie allevate sia selvatiche. *Streptococcus iniae* è stato isolato in Cina nel 2012 in un allevamento di storioni ibridi *Huso dauricus* x *Acipenser schrenckii* da fegato, rene e milza di soggetti moribondi e con sintomi clinici di malattia (Wang et al., 2014). Deng et al. (2017) in Cina descrivono un focolaio di *S. iniae* con massiva mortalità verificatasi in storioni siberiani tra agosto e ottobre 2013. I pesci affetti da malattia mostravano letargia, nuoto scoordinato e vorticoso sporadico, lento vicino alla superficie dell'acqua, colorazione scura della pelle, emorragie petecchiali sulla superficie corporea ed alla base delle pinne e circa il 20% di pesci malati mostrava ulcere cutanee. Quasi il 10% dei soggetti moriva con malattia iperacuta senza evidenti segni clinici. L'autopsia ha rivelato lesioni macroscopiche tra cui: idropericardio, granulomi biancastri sull'epicardio, petecchie nel fegato che appariva pallido, nel pancreas e nel peritoneo. In particolare, la milza e il rene erano di colore scuro e c'era una splenomegalia significativa. Alcuni pesci colpiti hanno mostrato addome rigonfio con ascite emorragica o giallastra. L'esame istopatologico ha rivelato una risposta infiammatoria multisistemica necrotizzante, che era particolarmente marcata in fegato, reni, cuore e cervello. I vasi sanguigni del fegato apparivano congesti e contenevano numerosi monociti. Gli epatociti intorno ai vasi sanguigni iperemici presentavano degenerazione e necrosi, con infiltrato linfocitario e macrofagico. Il rene era emorragico con necrosi focali e flogosi interstiziali. Degenerazione cellulare con sfaldamento di cellule epiteliali e cilindri proteici sono stati osservati nei tubuli renali. Nei glomerulari sono state osservate caratteristici batteri a catenella riferibili a streptococchi. Nel cervello si evidenziava meningoencefalite. Il cuore presentava miocardite ed epicardite. Ci sono state diverse altre segnalazioni di infezioni da questo patogeno su diverse specie di storione, tra lo storione cinese (*A. sinensis*) in Cina (Muhammad et al., 2020, figura 6), lo storione bianco in USA (*A. transmontanus*) (Pierezan et al., 2020; Soto et al., 2017) e lo storione dell'Adriatico in Italia (*A. naccarii*) (Mugetti et al. 2022). In Cina dove le streptococcosi ittiche sono un significativo problema sanitario nell'acquacoltura intensiva è stato isolato *Streptococcus dysgalactiae*, in storione amur (*Acipenser schrenckii*) con temperature comprese tra 28 e 30°C. Anoressia, nuoto incoordinato, a spirale, anemia branchiale, emorragie, gonfiore addominale e ascite sono i segni clinici osservati (Yang & Li, 2009).

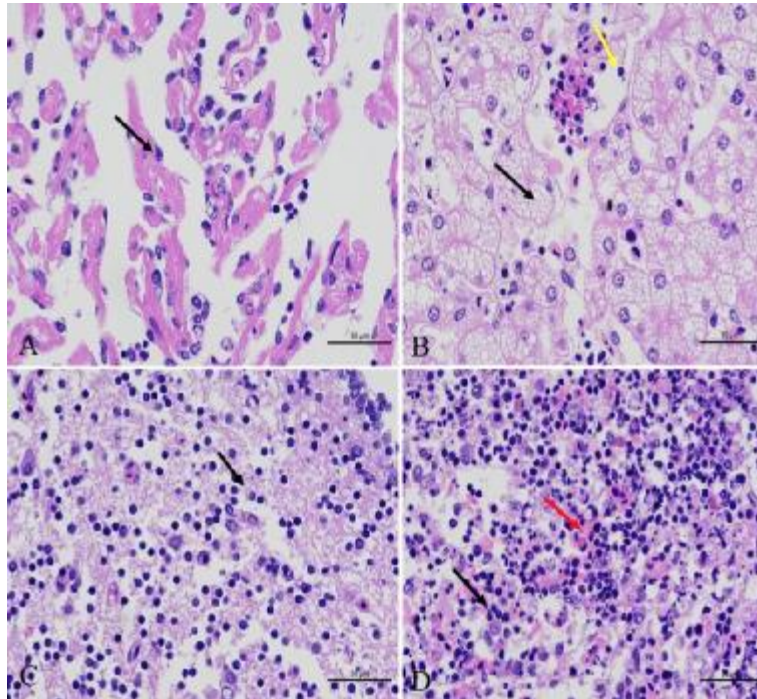


Figura 6: lesioni istologiche in storione cinese in presenza di *S. iniae*. Cuore, edema interstiziale (A). Fegato, epatociti con steatosi microvacuolare (B). Encefalo con fenomeni degenerativi (C). Milza, necrosi diffusa (D) (Muhammad et al., 2020).

Stafilococcosi

Rusev et al (2016) descrivono un episodio di coinfezione di *Staphylococcus warneri* e *Shewanella putrefaciens*, (Gram-) in giovanili di storione siberiano (*Acipenser baerii*) e storioni ibridi (*Huso huso* x *Acipenser baerii*) allevati con sistemi di acquacoltura a ricircolo nel nord della Bulgaria. I principali aspetti patologici consistevano in: ulcere cutanee (da 1 a 1,5 cm in diametro), emorragie multifocali sulla parte ventrale del corpo, muscoli di colore giallastro con emorragie multiple, milza iperemica, fegato di colore giallo ocre di consistenza fragile dalla consistenza fragile e caratterizzato da emorragie petecchiali superficiali. I vasi sanguigni mesenterici erano iperemici e gli intestini erano pieni di liquido emorragico. Colture batteriche pure di *Staphylococcus warneri* sono state isolate dal fegato e dalla milza e *Shewanella putrefaciens* dall'intestino.

Enterococcosi

Enterococcus-like con caratteristiche strettamente affini a *Enterococcus seriolicida* sono stati isolati dall'encefalo di alcuni campioni sintomatici di *A. naccarii* di due anni di età allevati in Italia. Gli individui mostravano inappetenza,

nuoto irregolare e circolare, nonché mortalità dopo qualche mese. In alcuni casi era possibile notare un lieve esoftalmo bilaterale o ascite (Salati et al., 1996).

Clostridiosi

Nel novembre 2020 un episodio di mortalità (30%) in storioni giovani siberiani e russi (*Acipenser baerii*, *A. gueldenstaedtii*) e in storioni ibridi GUBA (*A. gueldenstaedtii* × *A. baerii*) si è verificato in un incubatoio nel nord Italia, associata a grave distensione celomica e nuoto anormale in superficie inversa. Alla necropsopia si osservava dilatazione diffusa e grave dei tratti gastrointestinali con contenuto schiumoso ed assottigliamento delle pareti gastrointestinali. L'analisi istologica ha rivelato gradi variabili di desquamazione e necrosi dell'epitelio intestinale e la presenza di aggregati batterici. Sono stati isolati batteri Gram positivi anaerobi e *Clostridium perfringens* è stato isolato dall'intestino. Specifiche PCR hanno identificato il tossinotipo A e il gene della tossina β2. Lo squilibrio del microbiota intestinale, presumibilmente causato da ridotto regime alimentare, ha favorito lo sviluppo di *C. perfringens* con conseguente formazione di gas. La causa scatenante della clostridiosi sembra essere stato un dismicrobismo intestinale correlato da una dieta inadeguata (Brocca et al., 2022).

Batteri alcool acido resistenti

Dal 2009 al 2010 in Cina sono stati segnalati da Zhang et al. (2015) diversi focolai di micobatteriosi in storioni allevati, tra cui lo storione cinese (*Acipenser sinensis*) e lo storione dell'Amur (*Acipenser schrencki*). Complessivamente sono state identificate sette specie di *Mycobacterium*: *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium gordonae*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium szulgai*, *Mycobacterium arupense* e *Mycobacterium porcinum*. Tra queste, *M. marinum* è risultato essere la specie prevalente (89,5%) rispetto alle altre. I segni clinici degli storioni affetti, includevano: scolorimento della pelle, lesioni cutanee, debolezza, distensione addominale granulomi nel fegato. Micobatteriosi da *Mycobacterium chelonae* in storione russo è stata descritta in Italia da Antuofermo et al. (2014). Quindici storioni provenienti da un allevamento italiano che all'esame clinico mostravano masse a forma di cavolfiore a livello orale e cutaneo, sono stati sottoposti: a esame istologico, batteriologico e ad analisi molecolari. Sono state osservate un totale di 20 formazioni di differenti dimensioni, localizzate nell'apparato boccale e a livello delle pinne pettorali e caudali. Queste masse erano caratterizzate da un abbondante deposito di calcio e da lievi o severe infiammazioni granulomatose. *M. salmoniphilum*, sempre in Italia è stato identificato da Righetti et al. (2014). Durante questo studio, un giovanile di storione russo è stato recapitato al laboratorio di ittiopatologia dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, a Torino. Questo soggetto (3 anni di età)

proveniva da un allevamento del nord Italia, misurava 25 cm di lunghezza, pesava 250 g e mostrava sindrome cachettica. All'esame necroscopico è stata notata la presenza di numerose lesioni nodulari nel fegato e nel rene.

Focolai di micobatteriosi negli storioni allevati, compreso lo storione cinese (*Acipenser sinensis*), storione russo (*Acipenser gueldenstaedtii*) e Storione dell'Amur (*Acipenser schrencki*), sono stati identificati (Zhang et al., 2015, Antuofermo et al., 2014, Righetti et al., 2014).

2.4.2 Parassiti

2.4.2.1 Protozoi

Flagellati

Vi sono protozoi flagellati che si trovano piuttosto frequentemente nella maggior parte degli storioni a livello sistemico nel sangue. Quattro specie specifiche degli storioni sono state descritte in Russia: *Trypanosoma anura* descritto nel sangue di *Acipenser schrenckii* del fiume Amur; *Cryptobia acipenseris* in *Huso huso*, *A. gueldenstaedtii*, *A. stellatus*, *A. nudiventris* e *A. ruthenus* (il più parassitato) dei fiumi Don, Volga e Yenisei; *C. pseudoscaphirhynchi* riscontrato in *Pseudoscaphirhynchus kaufmanni* (con prevalenze di circa il 50%) del fiume Amudaria (Bauer et al. 2002). Secondo la letteratura disponibile, storioni del nord America *A. transmontanus* sono infettati da una sola specie di protozoi flagellati del sangue, *C. salmositica*. Questo parassita è ampiamente distribuito nei pesci d'acqua dolce del Nord America e quindi non può essere considerato specifico degli Acipenseridae. Una specie di flagellati (Polymastigota) *Hexamita truttae* è stata descritta in Russia nella cistifellea di *A. ruthenus*, *Huso huso*, *A. gueldenstaedtii*, *A. stellatus* (Izumova, 1977).

Ciliati

Molte specie di ciliati sono state riscontrate negli storioni e loro ibridi, specialmente su esemplari giovani. Principalmente sono rappresentanti delle famiglie: Epistylididae (*Apiosoma*) e Trichodinidae (*Trichodina*, *Trichodinella*, *Paratrichodina*, *Tripartiella*, *Dipartiella*). Una specie, *Paratrichodina uralensis* è stata riscontrata in *A. ruthenus* nel fiume Ob (Russia). *Ichthyophthirius multifiliis* è stato rilevato in *A. ruthenus* del fiume Volga (Lubarskaya & Levrent'eva, 1985) ed in *A. persicus* nel nord dell'Iran (Adel et.al 2016).

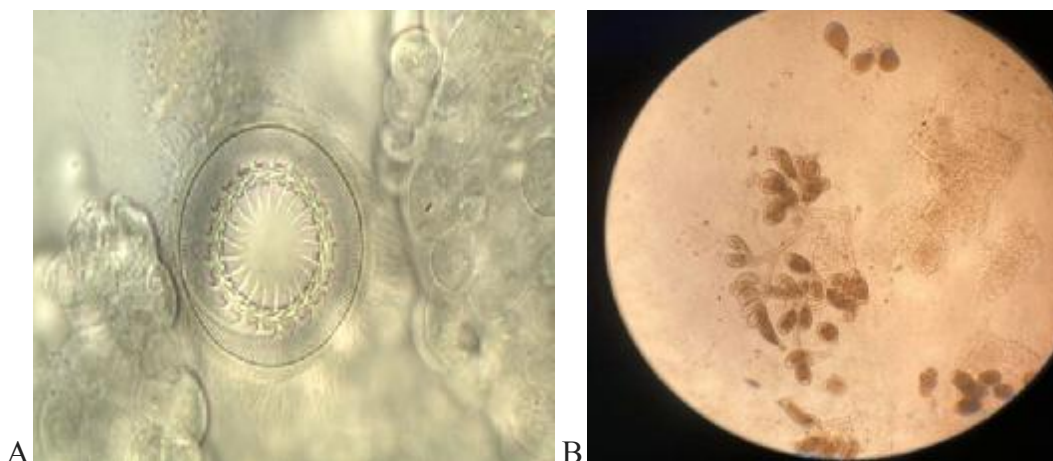


Figura 7: *Trichodina* spp. (www.lagazzettadellekoi.it) (A), *Epystilis* spp. (B).

Apicomplexa

Gli Apicomplexa sono parassiti unicellulari e sporigeni. Tutte le specie sono endoparassiti obbligate degli animali. Il nome del taxon Apicomplexa deriva da due parole latine - *apice* (in alto) e *complexus* (per un insieme di organelli nello sporozoite). Gli Apicomplexa costituiscono la maggior parte di quei microrganismi che un tempo erano definiti Sporozoa, un gruppo di protozoi parassiti, in genere privi di flagelli, ciglia o pseudopodi. La maggior parte degli Apicomplexa, tuttavia, sono mobili, grazie all'uso di un meccanismo di scorrimento che utilizza aderenze e piccoli motori statici di miosina. Un apicomplexa, *Haemogregarina acipenseris* è stato segnalato infettare gli eritrociti di *A. ruthenus* del fiume Volga. Nella maggior parte dei casi solo uno e raramente due parassiti sono stati riscontrati negli eritrociti degli storioni. Un coccidio non identificato del genere *Eimeria* è stato descritto nella parete intestinale di *A. baerii* del Fiume Selenga (bacino del lago Baikal) (Pronin, 1977); non si conosce l'effetto di questo parassita sulla salute del pesce.

Ameboidi

Negli Stati Uniti d'America, in un incubatoio di storione pallido (*Scaphirhynchus albus*), alla fine dell'estate del 2000, sono stati registrati alti tassi di mortalità (100% in alcune vasche) in avannotti (1,5 - 2,0 grammi) con temperatura dell'acqua di 17-18 °C. Altre specie ittiche erano mantenute presso la struttura di allevamento, compresi salmonidi. Gli storioni presentavano branchie leggermente pallide e rigonfie con aumentata presenza di muco. Le lesioni istopatologiche delle branchie sono grave iperplasia epiteliale e fusione lamellare. Un'infestazione parassitaria da amebe è stata descritta sulla superficie branchiale con grave iperplasia. Non è stata effettuata l'identificazione delle amebe. La malattia nodulare branchiale (NGD) da amebe colpisce i salmonidi in acqua dolce. È

possibile, data la storia di questi storioni, che si sia verificata un'infezione crociata trasmessa dai salmonidi nello stesso incubatoio o che si sia verificata la trasmissione da popolazioni di pesci selvatici (Stephen et al., 2002).

2.4.2.2 Metazoi

Myxozoa

Il phylum myxozoa comprende circa 1500 specie, tutte parassite, ripartite nelle classi *Myxosporea* e *Actinosporea*. La posizione sistematica di questo phylum è controversa. La determinazione di sequenze di RNA ribosomiale e di altre molecole e il loro confronto con quelle omologhe di altri organismi fanno ritenere che i Myxozoa non siano da considerare protozoi ma metazoi, e che i loro parenti più vicini siano un gruppo di Celenterati, che come i Myxozoa presentano fasi parassitarie intracellulari. L'ipotesi dell'appartenenza dei Myxozoa ai metazoi è anche avvalorata dal fatto, noto ormai da tempo, che essi possiedono spore multicellulari. Queste sono dotate di 143 valve, e contengono uno sporoplasma uninucleato o plurinucleato e fino a 6 capsule polari. Ciascuna capsula porta un filamento polare spiralato ed estroflettibile, che ha la funzione di ancorare la spora ai tessuti dell'ospite. La struttura e la funzione del filamento polare separano nettamente i Myxozoa dai Microspora cui erano precedentemente riuniti nell'unico phylum Cnidosporidi. Descrizioni di infezioni da Cnidosporidia (Myxozoa), in acipenseridi sia in acqua dolce sia in mare sono estremamente rare. Solo una specie di questo phylum è stata descritta negli storioni. *Zschokkella sturionis* può presentarsi nella cistifellea di: *A. sturio*, *A. gueldenstaedtii*, *A. stellatus* e *A. ruthenus*. I dati sulla sua patogenicità, tuttavia, non sono stati riportati.

Celenterata (Cnidaria)

I cnidari, o celenterati, costituiscono un phylum di animali a simmetria raggiata, diblastici ed acquatici. *Polypodium hydriforme*, che infetta le uova di acipenseriformi in Eurasia e Nord America, è la sola specie di questo phylum riscontrata negli storioni. Owsjannikow (1871) descrisse per la prima volta *Polypodium hydriforme* nelle uova dello sterleto del Volga (*A. ruthenus*). Ad oggi, *P. hydriforme* è stato trovato in 12 specie di Acipenseridae e in una specie dei Polyodontidae (Raikova, 1994).

Elminti

Trematodi monogenei

I trematodi monogenei degli storioni, appartengono a 10 specie, di cui il genere più noto è *Nitzschia* (famiglia Capsalidae). *Nitzschia sturionis* (figura 8) infetta le branchie di tutti gli storioni in Europa.

Nitzschia sturionis è un parassita piuttosto grande, di circa 10 mm di lunghezza. La sua diffusione negli storioni è estesa sia in mare sia in acque salmastre. Il parassita muore rapidamente in acqua dolce durante la migrazione dei pesci per la deposizione delle uova e può quindi essere riscontrato solo durante la prima fase della migrazione. Il parassita si rinviene generalmente sulle branchie e sul palato. Studi istologici di branchie infette hanno mostrato la degenerazione delle lamelle, con iperplasia dei filamenti (Lutta, 1941). Il secondo gruppo più rappresentativo dei Monogenea nelle branchie degli storioni comprende le specie appartenenti alla famiglia Diclybothriidae (Bychowsky & Gussew 1950). Queste specie differiscono fisiologicamente da quelle del genere *Nitzschia* per la presenza in acqua dolce e in estuari salmastri. *Diclybothrium armatum* è ampiamente diffuso in tutti gli storioni d'Europa e dell'Asia. Questa specie è stata descritta anche nel nord America. Un'altra specie di Diclybothriidae appartiene al genere *Paradyclibothrium*. *Paradyclibothrium pacificum* è stato osservato su branchie di *A. medirostris*. Questo genere differisce dal genere *Diclybothrium* per un minor diametro del disco adesivo e dalle dimensioni degli uncini (Skrjabina, 1974). Il ciclo biologico di questa specie non è stato ancora completamente chiarito. Poiché il parassita è stato riscontrato sulle branchie di *A. medirostris* durante la fase di vita marina si può ipotizzare che sia un organismo d'acqua salata.

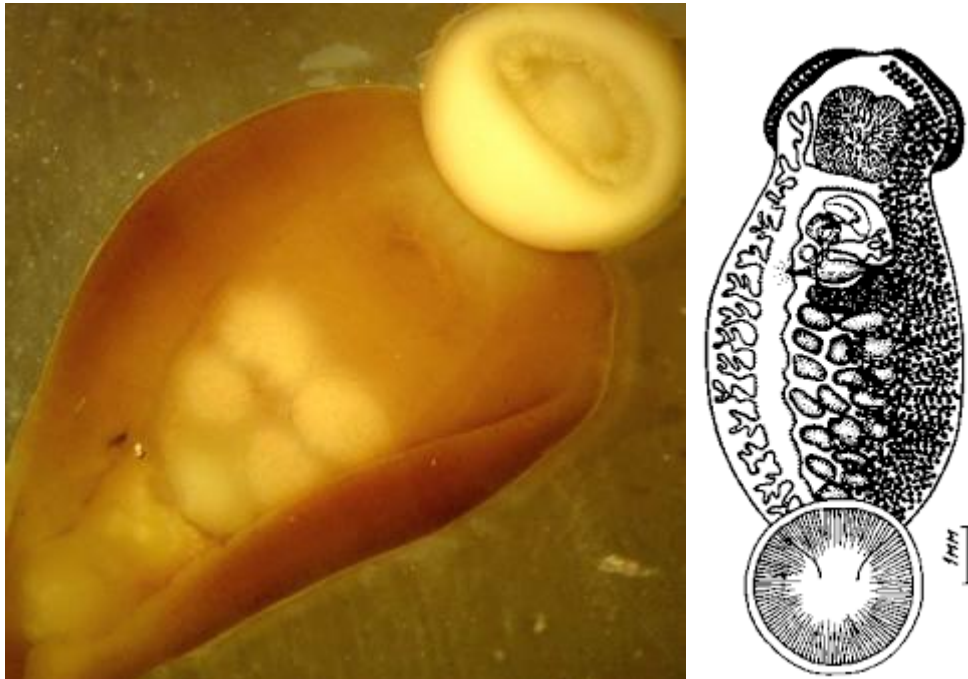


Figura 8: *Nitzschia sturionis* (www.researchgate.net),

Trematodi digenei

Sono state descritte circa 28 specie di trematodi digenei in acipenseridi, presenti in molte regioni della Russia (Skrjabina, 1974). Tuttavia, mentre la maggior parte di essi si verifica su un'ampia gamma di specie ittiche, solo cinque di esse sono specifiche per gli storioni. In linea di principio gli storioni sono raramente infestati da metacercarie rispetto a molte altre specie ittiche (in particolare in acqua dolce) (Bauer et al.2002).

Cestodi

Circa 20 specie di cestodi sono state riportate in acipenseriformi (Skrjabina, 1974). Questi endoparassiti sono di alta rilevanza per l'acquacoltura, in particolare quelle appartenenti all'ordine Amphilinidea. Sono vermi piatti piuttosto rari (a forma di foglia; 26–124 mm di lunghezza, 12–42 mm di larghezza, di colore bianco o marrone) che parassitano la cavità corporea di pesci e tartarughe. *Amphilina foliacea* è la più comune rappresentante di questo gruppo, infestando tutti gli Acipenseridae. Il suo ciclo biologico comprende diversi crostacei della famiglia Gammaridae come ospiti intermedi. I tassi di infestazione degli storioni da parte di *A. foliacea* possono variare molto all'interno dei sistemi fluviali russi. Questo può essere in parte spiegato anche dall'abbondanza di gammaridi. Elevati tassi di infestazione sono associati a riduzione del glicogeno. In alcuni casi si sono osservati gravi effetti sulle gonadi (Dubinin, 1952), con ripercussioni sulla riproduzione. Sono state descritte migrazioni del parassita nel fegato e in cavità addominale (Davydov & Kuperman, 1993).

A. japonica è stata descritta in Giappone e Russia. *A. bipunctata*, riportata in storioni del Nord America è sinonimo di *A. japonica* (Dubinina, 1982).

Sono state riscontrate diverse specie dell'ordine Spathebothriidea in storioni della Russia e paesi adiacenti, tra cui: *Bothriomonus fallax* in *H. huso*, *A. nudiventris*, *A. ruthenus*, *A. gueldenstaedtii*, *A. sturio* e *A. stellatus* nei bacini del Mar Nero, Azov e Mar Caspio. Questo grande cestode (fino a 170 mm di lunghezza; lunghezza del plerocercario fino a 25 mm, larghezza 1 mm) può infestare tutte le parti dell'intestino. Gli ospiti intermedi non sono ancora completamente noti ma è stato identificato *Dikerogammarus haemobaphes*. *Bothriomonus fallax* può essere trovato negli storioni solo durante la loro fase di vita marina, con i pesci più vecchi che apparentemente mostrano tassi di infestazione più elevati rispetto ai pesci più giovani.

Al contrario, è stato osservato maggiormente nelle forme giovanili di *A. sturio* e *A. stellatus* all'estuario del Danubio negli anni '70 (Skrjabina, 1974). In tutti i casi, nessuna lesione patologica era associata a queste infestazioni.

B. sturionis, descritta in storioni dell'Atlantico sembra interessare altre specie ittiche (Burt & Sandeman, 1969). *Cyathocephalus truncatus*, parassita dei salmonidi, è stato osservato in: *A. sturio* dal lago Ladoga; *A. ruthenus* e *A. baerii* dei fiumi Yenisey e Lena (Skrjabina, 1974). *Eubothrium acipenserinum* è stato descritto negli storioni del Mar Nero e del Mar Caspio. Questa specie appartiene all'ordine Pseudophyllidae, e si riscontra in pesci in ambiente salmastro. Quando i pesci infestati entrano in acqua dolce, il parassita non sopravvive. Il ciclo di vita di questo parassita non è ancora del tutto chiaro ma si può presumere che i copepodi siano certamente tra gli ospiti intermedi della specie. Cestodi parassiti di diverse specie ittiche sono stati rilevati anche negli acipenseriformi, fra questi: *Proteocephalo osculatus* (sin. *P. skorikowi*), *Bothriocephalus opsariichthydis* e *Silurotaenia siluri*, tipici parassiti dei siluridi.

Nematodi

Bauer et al. (2002) riportano che circa 30 specie di nematodi, comprese forme larvali, sono descritte in acipenseriformi, in particolar modo una specie della famiglia *Capillariidae* (*Piscicapillaria tuberculata*) ed una specie della famiglia *Cystoosidae* (*Cystoopsis acipenseris*). *P. tuberculata* è un parassita dulciacquicolo che è stato rinvenuto in storioni originari dei bacini della regione Ponto-Caspica (Skrjabina, 1974). La sua diffusione in ambiente marino avviene a partire da pesci migratori, parassitati durante la loro fase giovanile in acqua dolce. Probabilmente come per altri capillaridi, il ciclo biologico presenta fasi larvali in oligocheti (Moravec, 1994). Questo parassita infesta principalmente *A. ruthenus* inducendo flogosi nell'apparato gastroenterico (Dubinin, 1952). Il ciclo di vita di *Cystoopsis* è stato studiato per la prima volta da Janicky e Rashin (1928) in Russia. Questi autori hanno affermato che le uova liberate dalle femmine in acqua sono ingerite da diversi gammaridi (*Gammarus pulex*, *G. platycheir*,

Dikerogammarus haemobaphes e altri). Le uova schiudono nello stomaco e le larve rilasciate migrano in diversi organi del crostaceo, per lo più nelle appendici, dove si incistano. Lo stadio infettante si ottiene in circa due o tre settimane a seconda della temperatura dell'acqua. *Cystoopsis* è un parassita eurialino che ha come ospite definitivo principalmente *A. ruthenus* e, raramente, novellame di altri storioni anadromi. La mortalità dei giovani pesci può verificarsi quando il tasso di infestazione è alto (Ivanov, 1966). *Cystoopsis acipenseris* è stato segnalato in *A. transmontanus* in nord America.

Tre specie della famiglia Anisakidae appartenenti al genere *Hysterothylaceum* (*Contracaecum*) sono state osservate in acipenseriformi. Due di loro, *Hysterothylaceum aduncum* e *H. gadi*, si trovano in un'ampia gamma di pesci marini e anadromi. *H. aduncum* raramente infesta gli storioni ma *H. gadi* è piuttosto comune negli esemplari del Mar Nero. Queste specie possono usare il pesce come loro ospite paratenico o definitivo (Moravec, 1994). *Hysterothylaceum bidentatum* sembra essere specifico per gli storioni; si trova nei bacini del Mar Nero e del Caspio, meno frequentemente anche nelle zone costiere dei mari a bassa salinità (Skrjabina, 1974). I primi ospiti intermedi sono gammaridi e possibilmente simuliidi e chironomidi (Levashov, 1925; Geller e Babich, 1953).

Larve di *Anisakis* (*A. schupakowi*), un parassita endemico delle foche del mar Caspio, sono state riscontrate negli organi interni di *A. gueldenstaedtii*. *Anisakis simplex*, *Raphidascaris acus*, *Contracaecum microcephalum* e *Porrocaecum reticulatum* sono stati segnalati in stadio larvale nello storione (Skrjabina, 1974). Tre specie del genere *Cucullanus* (famiglia Cucullanidae) si riscontrano negli storioni. *C. sphaerocephalus* infetta lo stomaco e l'intestino di tutte le specie europee di storioni. *C. lebedevi* infesta lo storione siberiano e le specie del Pacifico. Entrambe le specie sono eurialine. La terza specie di questo genere, *C. clitellaris* è stata descritta in acipenseridi d'acqua dolce americani. Choudhury (1998) considera *C. lebedevi* sinonimo di *C. clitellaris*. Sono state rilevate tre specie della famiglia Camallanidae negli storioni in Russia. Circa 10 specie del genere *Rhabdochona* (famiglia Rhabdochonidae) si trovano negli acipenseriformi ma sono tutti rari o considerati parassiti accidentali (Skrjabina, 1974). Sei specie della famiglia Cystidicolidae si trovano negli storioni. Alcuni di loro sono parassiti accidentali. Due specie del genere *Capillospirura*: *C. ovotrichuria* e *C. argumentosa* sono state trovate nell'intestino di storioni russi. *Cyclozone acipenserina* è un parassita specifico di storioni nei bacini del Mar Nero e del Caspio. Il ciclo biologico è sconosciuto. I dati sulla patogenicità sono assenti.

Acantocefali

Sono state rilevate dodici specie di acantocefali negli acipenseriformi (Skrjabina, 1974). La maggior parte sono parassiti rari o accidentali degli storioni. *Pseudoechinirhynchus clavula* e *Pomphorhynchus laevis* hanno una vasta gamma

di pesci ospiti. Una sola specie, *Leptorhynchoides plagicephalus* è specifico per gli storioni ed è presente: nel Baltico, nel Mediterraneo, nel Mar Nero e nel Caspio. L'ospite intermedio è *Gammarus pulex*. Il parassita può infettare *A. ruthenus* così come altri storioni migratori durante i periodi di vita in acqua dolce e marina provocando infiammazione intestinale.

Hirudinea

Sei specie di irudinei sono state trovate su storioni. Cinque specie, *Limnotrachelobdella turkestanica*, *L. okae*, *Piscicola geometra*, *Caspiobdella fadejewi* e *Hemiclepsis marginata*, hanno una vasta gamma di pesci ospiti. Una sola specie, *Acipenserobdella volgensis* sembra essere specifica per lo storione (*A. nudiventris*, *A. ruthenus*, *A. baerii*).

Crostacei copepodi

Nove specie di crostacei copepodi ectoparassiti sono state riscontrate in storioni. Sei di loro (*Ergasilus sieboldi*, *Paraergasilus rylovi*, *Lernaea cyprinacea*, *L. elegans*, *Caligus lacustris*, *Argulus foliaceus*) sono parassiti di diverse specie ittiche e sono noti causare danni in acquacoltura. Tre specie sono specifiche per gli storioni: *Pseudotracheiastes stellatus*, *P. soldatovi*, *Dichelesthium oblongum*. Questi parassiti in quanto ematofagi provocano anemia.

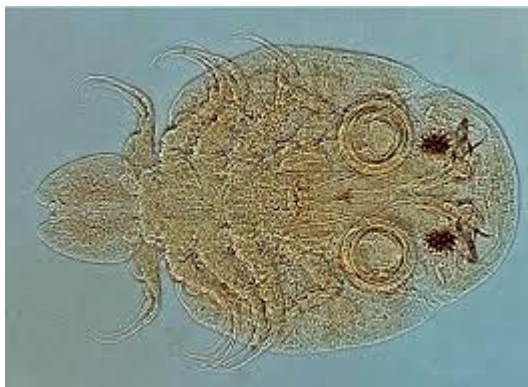


Figura 9: *Argulus* spp. (www.researchgate.net)

2.4.3 Funghi

Microsporidia sono un gruppo di parassiti unicellulari formanti spore. Un tempo erano considerati protozoi o protisti, attualmente sono considerati appartenere al regno dei funghi o un gruppo affine ai funghi. *Pleistophora sulci* è stato descritto nelle uova di *A. ruthenus*, *A. gueldenstaedtii* e *A. baerii*. Le uova infette sono bianche e piuttosto grandi rispetto alle uova sane. I pansporoblasti con spore mature sono trovati al centro delle uova infette, mentre alla periferia sono presenti

le spore immature. La patogenicità del parassita non è elevata, poiché in tutti i casi descritti solo una piccola percentuale delle uova sono state osservate infettate. Un microsporidio non identificato del genere *Glugea* è stato trovato in: intestino, rene e vescica natatoria di *A. baerii* del Fiume Selenga (bacino del lago Baikal) (Pronin, 1977). Le malattie fungine causate dalle Saprolegniaceae sono di notevole importanza, soprattutto per l'incubazione delle uova di storione. La mortalità delle uova durante questo periodo raggiunge a volte 70 – 90%. Sono state trovate tredici specie di agenti patogeni, tra cui: *Saprolegnia* (sette specie), *Achlia* (due specie), *Aphanomyces* (una specie), *Dactyulus* (due specie) e *Zeptolonia* (una specie). I più comuni sono *S. parasitica*, *S. ferax* e *Dictyudius monosporus* (Bauer et al.2002).

2.4.4 Malattie virali

Tra tutte le malattie, quelle virali causano spesso i danni di maggiore entità e possono vanificare i programmi di ripopolamento di acipenseridi, intrapresi da molti stati, compresa l'Italia (Stachnik et al., 2021). Non esistono trattamenti per le virosi degli storioni. Prevenire il contatto tra pesci suscettibili e pesci infetti è pertanto cruciale. Indagini sanitarie, che precedono lo spostamento di lotti di storioni, o effettuate durante episodi di mortalità, dovrebbero sempre comprendere gli esami virologici (Hedrick et al.,2001).

Il controllo delle patologie virali di contro è molto impegnativo a causa di lacune conoscitive sull'epidemiologia e sui metodi diagnostici (Ciulli et al., 2016). Molti ceppi virali sono stati tuttavia identificati e descritti da vari autori di molti paesi dagli anni '80 ad oggi (Mugetti et al., 2020).

2.4.4.1 Alloherpesviridae

Acipenserid Herpesvirus 1 (AciHV-1)

Acipenserid herpesvirus 1 (AciHV-1) è stato il primo herpesvirus ad essere identificato negli storioni. Il primo caso è stato riportato nel 1989 in giovanili di *A. transmontanus*, riprodotti in California. AciHV-1 ha prodotto sincizi ed è stato isolato su specifico monostrato cellulare di epitelio di storione (WSSK-1). La diagnosi è stata effettuata mediante: esami istologici con osservazione di lesioni necrotiche a carico del tessuto epiteliale e microscopia elettronica evidenziando virioni con capsidi esagonale, riferibili ad herpesvirus. Altri casi di AciHV-1 in storione bianco sono stati riportati in America e in Europa (Italia); questi casi sono stati descritti in studi filogenetici e non sono stati descritti sintomi di malattia (Kelley et al., 2005; Kurobe et al., 2008).

Acipenserid Herpesvirus 2 (AciHV-2)

Acipenserid herpesvirus 2 (AciHV-2) è stato isolato pochi anni dopo AciHV-1 ed è attualmente l'unico herpesvirus dello storione ufficialmente nominato dalla ICTV (Commissione Internazionale per la Tassonomia dei Virus) e incluso nel genere degli *Ictalurivirus* (Hanson et al., 2016).

AciHV-2 è stato isolato per la prima volta in California nel 1991 in un allevamento di *A. transmontanus*, da fluido ovarico. Gli storioni bianchi subadulti e adulti non mostravano particolari segni clinici. Il virus è stato isolato in coltura cellulare di milza di storione bianco (WSS-2). Sperimentalmente è stata dimostrata una maggiore virulenza di AciHV-2 (mortalità superiore all'80%) rispetto ad AciHV-1 (mortalità del 35%) (Watson et al., 1995). In seguito il virus si è diffuso in: Idaho, Oregon, Wisconsin e Canada settentrionale, interessando altre specie di storione (*A. brevirostrum*, *A. fulvescens*) (Lapatra et al., 2014; Kelley et al., 2005; Kurobe et al., 2008; Hanson et al., 2016). La suscettibilità ad AciHV-2 è stata dimostrata sperimentalmente inoltre in *Scaphyrhynchus albus* e *Scaphyrhynchus platyrhynchus* (Radosavljevic et al., 2019). AciHV-2 è stato successivamente descritto in giovanili di storione siberiano e ibridi Bester (*A. ruthenus* x *H. huso*) allevati in Russia che presentavano elevata mortalità. Si è trattato del primo isolamento virale dello storione in Russia e l'agente eziologico è stato denominato Siberian sturgeon herpesvirus (sbSHV) (Shchelkunov et al., 2009). Secondo la nomenclatura ufficiale, SbSHV è considerato essere una variante di AciHV-2 (Dospoly & Shchelkunov, 2010; Dospoly et al., 2017). AciHV-2 è stato isolato su diverse linee cellulari (WSSK-1, WSS-2, WSLW, WSGO, SSO-2, SSF-2) mostrando effetti citopatici tipici.

Cyprinid Herpesvirus 3 (CyHV3)

Anche se non è un patogeno specifico degli storioni, Cyprinid Herpesvirus-3 (CyHV-3) o KoiHerpesvirus (KHV) è stato segnalato anche negli acipenseridi. I due casi documentati riguardano lo storione atlantico (*A. oxyrinchus*), lo storione russo e l'ibrido Bester (Kempter et al., 2009; Pospichal et al., 2016).

Poiché è stato evidenziato il solo DNA virale, non ci sono sufficienti informazioni per poter sostenere l'ipotesi di una reale infezione, come indicato dai criteri presenti nel manuale OIE (OIE, 2019). Queste segnalazioni sono comunque rilevanti in quanto gli storioni potrebbero essere potenziali portatori di questa importante malattia notificabile.

2.4.4.2 Adenoviridae

White Sturgeon Adenovirus 1 (WSAdV-1)

Le infezioni nei pesci da adenovirus sono piuttosto rare. Particelle virali adeno-like sono state osservate sporadicamente alla microscopia elettronica in differenti specie ittiche (*Gadus morhua*, *Limanda limanda*, *Pagrus major*, *Anguilla japonica*) (Jensen et al., 1980; Ono et al., 2007). L'unica malattia ittica da adenovirus nota è la malattia da deperimento dello storione bianco (*A. transmontanus*), riscontrata in allevamento, infezione cronica associata ad Adenovirus-1 dello storione bianco allevato (White Sturgeon Adenovirus 1 = WSAdV-1).

La prima segnalazione risale al 1984 e descrive particelle adeno-like osservate in larve di storione bianco in un allevamento in California (Hedrick et al., 1985). Questo studio ha riportato la sintomatologia clinica e le osservazioni al microscopio, poichè l'isolamento virale su diverse linee cellulari non ha avuto esito positivo. In storioni bianchi del fiume Columbia, LaPatra et al. (1998) hanno isolato il virus su monostrato cellulare e riprodotto la malattia sperimentalmente. WSAdV-1 è l'unico adenovirus classificato dalla ICTV nei pesci (Harrach et al., 2011). Il sequenziamento di alcuni geni di WSAdV-1 ha rilevato l'unicità di questo virus che è servito come base per stabilire un genere separato, ichtadenovirus, all'interno della famiglia Adenoviridae.

I sintomi principali della malattia sono: letargia, anoressia, emaciazione con mortalità cumulativa fino al 50%. La sintomatologia clinica è stata osservata solamente nei giovanili (Hedrick et al., 1985; LaPatra et al., 1998). All'esame necroscopico le lesioni più evidenti sono pallore epatico e tubo gastroenterico vuoto. I virioni sono stati osservati in microscopia elettronica nei nuclei cellulari dell'epitelio della valvola a spirale e dell'intestino. WSAdV-1 cresce su cellule epiteliali spleniche di storione bianco (WSS-2) (Benk'o et al., 2002).

2.4.4.3 Malattie virali minori

La necrosi ematopoietica infettiva (IHN) è causata da un *Novirhabdovirus* che tipicamente infetta i salmonidi ed è una malattia notificabile (OIE, 2019). Uno studio ha mostrato che *A. transmontanus* è sensibile a IHN producendo anticorpi neutralizzanti (LaPatra et al., 1995). L'OIE però definisce gli storioni come "specie ad evidenza incompleta di sensibilità" (OIE, 2019). A questo proposito, controlli sanitari si rendono indispensabili, in quanto gli storioni possono fungere

da vettori della malattia essendo spesso presenti in un contesto ove sono allevate specie vulnerabili a IHN come la trota iridea (*O. mykiss*) (Pedron, 2016).

Vicenova et al. (2011) hanno riportato un caso di viremia primaverile della carpa SVC da rhabdovirus carpio in *A. baerii* allevati assieme ad altre specie di ciprinidi in Repubblica Ceca. In storione russo, un caso di betanodaviosi, agente eziologico della necrosi nervosa virale (VNN) è stato riportato in Grecia (Athanassopoulou et al., 2004). Lo storione pesava 500 g e mostrava sintomatologia clinica con lesioni neurologiche. *Betanodavirus* è stato identificato mediante PCR da campioni di encefalo. Nessun virus è stato trovato a carico della retina dello storione, sede d'elezione di *Betanodavirus* in altri pesci sensibili.

Infine, sono stati segnalati anche casi di: necrosi pancreatica infettiva (IPN) da birnavirus in storione siberiano; infezione da virus papova-like in storione bianco; reovirus della famiglia *Aquareoviridae* in storione cinese (Radosavljević et al., 2019; Pedron, 2016).

2.4.4.4 Virus Nucleocitoplasmatici a grande DNA dello storione (sNCLDV)

Mugetti et al. (2020) riportano che i Virus Nucleocitoplasmatici a grande DNA dello storione (sturgeon NucleoCytoplasmatic Large DNA Viruses = sNCLDV) rappresentano il gruppo più importante ed eterogeneo di agenti virali degli storioni. Questi virus colpiscono il sistema tegumentario, e possono provocare elevate mortalità in giovanili di varie specie di storioni. Molti di questi virus sono stati genericamente identificati come “iridovirus” ma recenti studi filogenetici hanno mostrato che, escludendo Frog Virus 3, le loro sequenze sono maggiormente affini alla famiglia *Mimiviridae* (Chinchar et al., 2017; Clouthier et al., 2018). Questa famiglia include una varietà di grandi virus che colpiscono organismi eucarioti, principalmente alghe e protisti. Tutti i virus menzionati in questo lavoro nei prossimi paragrafi appartengono a questo gruppo.

White Sturgeon Iridovirus (WSIV)

WSIV è un virus a DNA a doppia elica, epiteliotropo che infetta: cute, branchie e il tratto iniziale del tubo digerente. La malattia da iridovirus dello storione bianco, rappresenta una delle più importanti patologie della specie e causa elevate mortalità (fino al 95 %) negli avannotti di *A. transmontanus* in nord America e di storione russo in Europa. WSIV potrebbe inoltre infettare altre specie di acipenseriformi (è stata condotta un'infezione sperimentale in *A. fluvescens*) (Hedrick et al., 1992). Hofsoe –Oppermann et al. (2019) hanno evidenziato il DNA di WSIV in varie specie di storione (*Huso huso*, *A. ruthenus*, *A. baerii*, *A. gueldenstaedtii*, *A. oxyrinchus*, *A. sturio*) ed in alcuni ibridi. Le vie di trasmissione per questo virus non sono completamente chiarite. La malattia sembra aver avuto origine, per trasmissione verticale, da storioni adulti selvatici usati come

riproduttori (LaPatra et al., 1994; Soto et al., 2017; Raverty et al., 2003). La trasmissione orizzontale è stata dimostrata in incubatoio e sperimentalmente in laboratorio. La mortalità è maggiore in storioni di piccole dimensioni ed è strettamente correlata alle scarse condizioni di stabulazione. Situazioni stressanti, parametri ambientali scadenti, alta densità di allevamento, manipolazione eccessiva o riduzione temporanea del flusso dell'acqua sono fattori predisponenti (Georgiadis et al., 2001). La mortalità può manifestarsi anche in individui adulti sebbene con incidenza minore (Georgiadis et al., 2000). L'infezione della mucosa orale e dell'epitelio dell'organo olfattorio nelle narici si presume essere la causa della perdita dell'appetito dei pesci con progressivo e grave dimagrimento e decadimento delle condizioni generali di salute (principale segno clinico della malattia). La morte si manifesta dopo 2-3 settimane dall'inizio dell'infezione con temperatura dell'acqua compresa tra 17-19 °C. Spesso sono segnalate infezioni secondarie da protozoi ectoparassiti e batteri che contribuiscono ad aumentare la mortalità (OIE, 2000). Durante gli episodi di malattia le branchie si presentano edematose ed anemiche. Arrossamenti, emorragie e petecchie nella parete dell'addome e sugli scudi ossei ventrali possono essere talvolta presenti. Non sussistono lesioni agli organi interni poiché il virus non agisce in modo sistemico. All'esame istologico della cute colorata con ematossilina ed eosina si osserva: iperplasia da focale a diffusa con caratteristiche cellule malpighiane ipertrofiche da anfofile a basofile. Tali cellule si osservano anche nelle branchie. Alla microscopia elettronica (*Figura 10*) si osservano nel citoplasma numerose particelle virali a simmetria icosaedrica con doppio capsido e denso centro nucleoidale, di dimensioni comprese tra 250-300 nm. La diagnosi di WSIV può essere formulata utilizzando metodi molecolari, isolamento su colture cellulari e microscopia elettronica. L'ibridazione in situ, a causa della bassa sensibilità, non è consigliata per la diagnostica (Hofsoe-Oppermann et al., 2019; Hedrick et al., 1992). La profilassi si basa principalmente sulla prevenzione con introduzione in allevamento di storioni certificati, sani e isolamento delle nuove introduzioni mediante quarantena (OIE, 2000).

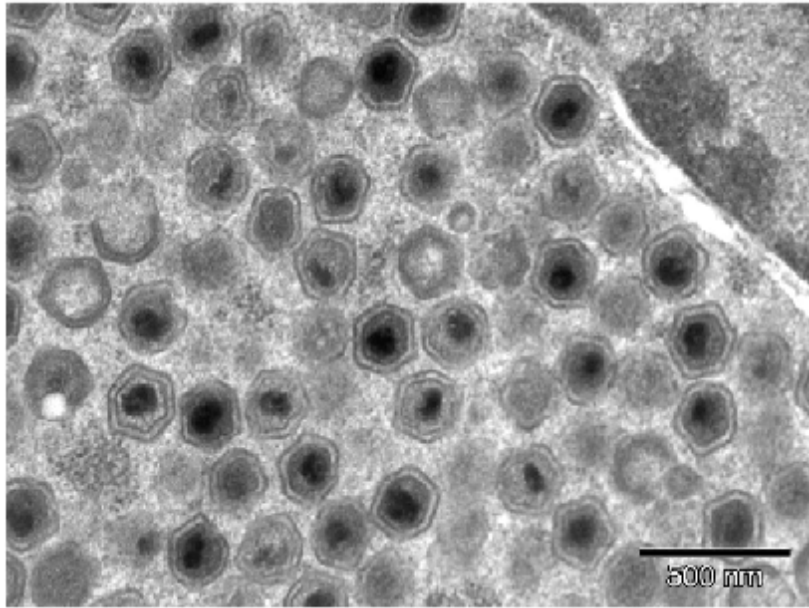


Figura 10: particelle virali di WSIV in cellule epiteliali di *A. transmontanus* osservate al microscopio elettronico a trasmissione (TEM) (Drennan et al., 2006).

Missouri River Sturgeon Iridovirus (MRSIV)

L'iridovirus dello storione del fiume del Missouri (MRSIV) è strettamente affine all'iridovirus dello storione bianco (WSIV) ed è associato ad episodi di malattia con mortalità, a partire dal 1999, in incubatoi di storione pallido *S. albus* e storione "shovelnose" *S. platyrhynchus*, specie originarie del Missouri e del Mississippi. MRSIV condivide molte caratteristiche tipiche degli altri sNCLDV associati a gravi infezioni cutanee e branchiali di diverse specie di storione. I segni clinici della patologia sono: cachessia, apatia, dimagrimento, flogosi cutanee. All'esame istologico le cellule epiteliali infette di rivestimento cutaneo, in particolare delle pinne, sono ipertrofiche con nuclei pleomorfi ed eccentrici e con colorazione da anfofila a eosinofila del citoplasma, nelle sezioni con ematossilina ed eosina. Alla microscopia elettronica, le particelle virali presenti nel citoplasma delle cellule epiteliali, sono caratterizzate da capsidi esagonale di 254 nm di diametro. La totalità degli individui dei diversi lotti di *S. platyrhynchus* sono morti in seguito all'infezione. MRSIV non è mai stato isolato su monostrato cellulare; sono stati solamente individuati i virioni tramite microscopia elettronica all'interno delle cellule epiteliali (Kurobe et al., 2011).

Shortnose Sturgeon Virus (SNSV)

In letteratura è stato descritto un solo caso di Shortnose Sturgeon Virus (SNSV) in avannotti di *A. brevirostrum* ottenuti da riproduttori di provenienza selvatica in Canada (LaPatra et al., 2014). All'istologia le cellule epiteliali branchiali

apparivano ipertrofiche, con citoplasma basofilo, caratteristica delle infezioni da iridovirus. Crescita batterica in coltura è stata ottenuta da lesioni cutanee, ma non dagli organi interni. Clouthier et al. (2015), in uno studio prettamente incentrato sulla filogenesi, hanno conferito al virus l'attuale denominazione.

British Columbia White Sturgeon Virus (BCWSV)

Nel 2001, BCWSV è stato isolato in storione bianco, allevato in British Columbia, Canada. Gli storioni (8-10 cm di lunghezza) presentavano: apatia, nuoto in superficie e dimagrimento. Lo stesso studio filogenetico relativo al SNSV ha reso disponibili anche le sequenze geniche di BCWSV (Clouthier et al., 2015).

Namao Virus (NV)

Clouthier et al. (2015) hanno segnalato la presenza di un ulteriore ceppo virale che ha causato perdite in avannotterie di *A. fluvescens* nella regione del lago Manitoba in Canada. I principali segni clinici ossevati sono: inappetenza, letargia, arrossamenti cutanei, emorragie e iperproduzione di muco branchiale. Effetti citopatici sono stati ottenuti in colture cellulari ottenute da esemplari selvatici di storioni del lago Manitoba. Inoculazione di NV su altre linee cellulari di storione, quali White Sturgeon SKin-1 (WSSK-1), hanno avuto esito negativo.

Frog Virus 3 (FV3)

Frog virus 3 è l'unico membro effettivo della famiglia *Iridoviridae* (non appartenente alla famiglia *Mimiviridae*) che è attualmente incluso nel genere *Ranavirus* e noto causare infezioni negli acipenseriformi (Chinchar et al., 2017). Negli Stati Uniti è stato riportato un episodio di malattia con mortalità, superiore al 90%, in esemplari giovanili di storione pallido (*S. Albus*) allevati in Missouri. L'identificazione si è avvalsa di: istologia, saggi biomolecolari e microscopia elettronica (Waltzek et al., 2014).

Acipenser Iridovirus European

Acipenser iridovirus-European (AcIV-E) è uno sNCLDV che infetta varie specie di acipenseridi, il cui genoma non è stato ancora completamente sequenziato (Bigarré et al., 2017; Ciulli et al., 2016). Adkison et al. (2018) descrivono episodi di mortalità da iridovirus protratti per oltre 5 anni, in avannotti di storione russo di due mesi di vita allevati in nord Europa. L'origine del virus non era determinata ma era correlata con l'introduzione in allevamento di *A. baerii* e ibridi tra *H. huso* e *A. gueldenstaedtii*. Gli autori non riportano dati diagnostici molecolari. In anni più recenti (2014-2016) a seguito di numerosi episodi di mortalità un nuovo virus, provvisoriamente chiamato AcIV-E è stato ritrovato in 3 paesi europei, associato

a 4 specie di storione: Adriatico, Siberiano, Russo e Beluga. Per l'identificazione ci si è avvalsi di metodi generici di PCR poi affinati e resi specifici per l'identificazione di questo virus (Bigarrè et al 2017; Ciulli et al 2016). AcIV-E non è mai stato isolato in colture cellulari e poiché il virus non è mai stato sequenziato completamente, la sua caratterizzazione è particolarmente complicata. Ad oggi, è disponibile solo una sequenza di 6 kb che comprende la proteina principale del capsido (MCP) e un fattore di replicazione C(RFC). Per quanto noto, basandosi sulla sequenza parziale del gene MCP, AcIV-E è geneticamente distinto, ma altamente correlato ai virus americani, ciò rende plausibile che AcIV-E abbia un'origine americana. Alcune ricerche indicano che AcIV-E è molto più diffuso che in passato nella storionicoltura europea dove è associato a morbilità e mortalità. L'impatto della virulenza varia moltissimo in relazione alla specie ospite di storione, l'età dei soggetti, la presenza di altri patogeni, fattori di stress e altre cause non identificate. Il genotipo del virus probabilmente è correlato alla virulenza ma sono necessari ulteriori studi per approfondire questo aspetto (Pallandre et al., 2019).

Lo storione russo sembra essere la specie più suscettibile all'infezione da AcIV-E. In questa specie la mortalità in giovanili, generalmente dell'età di 4-10 mesi, è stata segnalata in numerosi allevamenti. La grande commercializzazione di storioni a livello europeo ed internazionale è alla base della circolazione e della larga diffusione di questi virus. Questo è stato evidenziato da uno studio recente, nel quale si descrive come nell'estate del 2017, in un allevamento a ricircolo in Svezia, si sia verificato un episodio di malattia con mortalità del 30% in un lotto di 2000 giovanili di storione siberiano (*A. baerii*) provenienti da un'azienda italiana. A causa di condizioni stressanti, la mortalità si manifestava nel periodo compreso tra il trasporto e l'acclimatazione nelle nuove vasche. Nell'arco temporale di due mesi solo il 5% dei soggetti era ancora in vita (Axén et al., 2018). Poiché l'allevamento Svedese era di nuova costruzione, è evidente come il commercio possa essere la fonte di introduzione di nuovi patogeni in aree indenni. Mugetti et al. (2020) riportano infine il primo caso di infezione da AcIV-E con mortalità verificatosi nel 2018 in avannotti allevati in nord Italia di storione stellato (*A. stellatus*) e di sterleto (*A. ruthenus*). Nello stesso allevamento erano presenti giovanili di storione russo positivi ad AcIV-E. Le analisi molecolari sono state eseguite a partire da campioni di branchie per amplificare un frammento del gene MCP usando il saggio di real time PCR. Il DNA dei campioni positivi è stato in seguito sequenziato e sono state eseguite analisi filogenetiche, le quali confermavano l'ipotesi del passaggio del virus dallo storione russo a queste altre specie potenzialmente sensibili all'infezione. La sintomatologia clinica nei vari contesti includeva inappetenza, letargia, progressivo dimagrimento, nuoto privo di coordinazione. All'esame istologico era possibile notare ipertrofia delle lamelle branchiali e dell'epitelio orofaringeo, nonché necrosi, carioressi e citomegalia delle cellule epiteliali con inclusioni citoplasmatiche anfofiliche (Ciulli et al., 2016; Adkison et al., 2001; Bigarrè et al., 2017).

PARTE SPERIMENTALE

2.5 Caso di studio

Nel 2021, una società agricola con sede a Goito (MN), che storicamente lamentava episodi di malattia in giovanili di storione russo (*Acipenser gueldenstaedtii*), presentava durante il periodo estivo all'interno di uno dei comparti di avannotteria, elevata mortalità con sospetta eziologia virale. È stata così proposta un'indagine sanitaria in allevamento tramite un campionamento selettivo e una collaborazione con l'università degli studi di Padova e l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSVE) per accertare le cause della mortalità.

La suddetta società agricola ha iniziato l'allevamento di questa specie di storione nel 2015 tramite l'acquisto di riproduttori e di giovanili (provenienti da un altro allevamento italiano) e già nell'estate del 2017 veniva segnalato un episodio di grave mortalità che interessava l'80% degli individui nel loro primo anno di vita. A partire dal 2018 sono state eseguite le prime riproduzioni di *A. gueldenstaedtii* con semina di progenie propria in allevamento. Durante il primo anno di vita, sono state attuate metodiche di riduzione della densità in vasca con l'obiettivo di minimizzare lo stress dei pesci e migliorare le condizioni di allevamento. Nonostante questi accorgimenti nell'estate 2019 e 2020 si sono ripresentati eventi di mortalità che hanno indotto gli allevatori a voler intraprendere la suddetta indagine sanitaria.

2.6 Obiettivo dello studio

L'obiettivo del nostro studio è stato quello di verificare se gli episodi di mortalità ricorrenti in questo allevamento potessero essere attribuiti ad un patogeno virale, e in caso affermativo seguire l'andamento della patologia nell'arco del tempo, correlando diversi fattori che avrebbero definito il decorso patologico.

2.7 Organizzazione e caratteristiche delle vasche

La schiusa delle uova (25/05/2021) e lo svezzamento degli *Acipenser gueldenstaedtii* (progenie di riproduttori già presenti da 4 anni nell'impianto) sono stati effettuati inizialmente in un complesso di avannotteria (denominato da ora in avanti avannotteria 1 o av.1). Lo svezzamento è avvenuto in 10 vasche coibentate, in vetroresina, dalla capacità di 415 litri ciascuna, disposte in parallelo in 5 file. Queste vasche non sono state riempite tutte contemporaneamente, bensì in base all' accrescimento degli animali. Gli storioni, nelle seguenti date, sono stati così distribuiti: 25/05/2021, 13728 storioni in 2 vasche; 08/06/2021, 13344 storioni in 3 vasche; 22/06/2021, 12582 storioni in 6 vasche; 06/07/2021, 12530 storioni in tutte e 10 le vasche. Tutte le vasche del complesso ricevevano acqua da un pozzo situato a 40 metri di profondità. Prima di giungere nelle vasche l'acqua era dapprima trattata con un sistema meccanico a cestelli per ridurre la saturazione di gas disciolti in acqua a profondità elevata, e quindi raccolta in una vasca collettrice in cui un sistema di riscaldamento manteneva costanti le temperature dai 16 ai 18 gradi celsius in base alle esigenze degli operatori per la schiusa delle uova e lo svezzamento delle larve. L'impianto in questione era a ciclo aperto. I ricambi idrici erano sufficienti a mantenere condizioni di allevamento ottimali (O_2 saturo al 70%, pH: 8, NH_4 , NO_2^- , NO_3^- : in concentrazioni trascurabili).

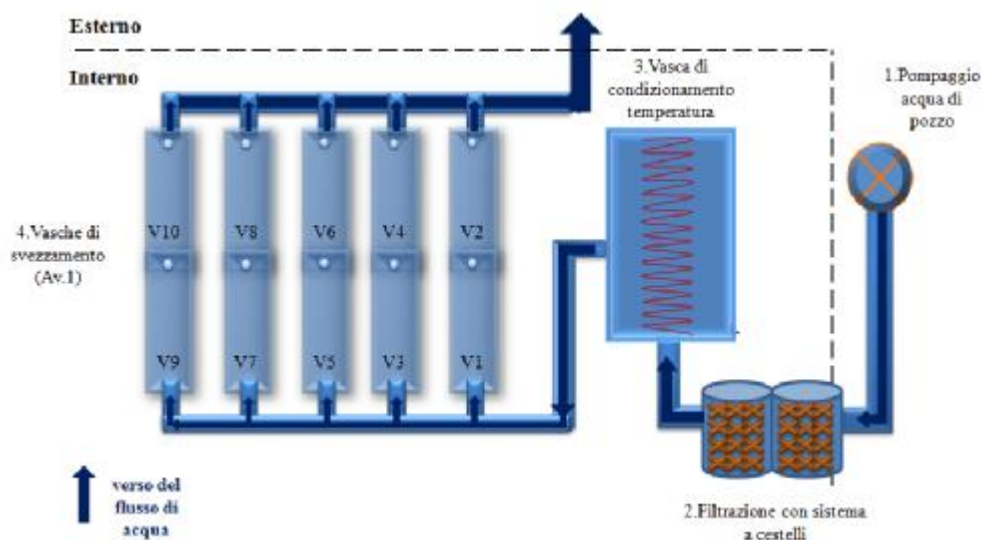


Figura 11: mappa schematica del complesso di svezzamento “avannotteria 1” (Av.1)

A partire dal 16 luglio (52 giorni dopo la schiusa delle uova) gli storioni sono stati spostati in un secondo complesso di avannotteria (denominato da ora in avanti

avannotteria 2 o av.2). questo complesso era situato nella zona più a monte dell'allevamento ed era composto da 26 vasche tutte in vetroresina e della capacità di 1800 litri ciascuna. Le vasche erano disposte in parallelo e ricevevano acqua tramite pompe da due differenti origini (figura 13):

- 1) una roggia con argini in terra che confluisce a valle dell'allevamento con un canale limitrofo in cui peraltro lo scarico della sezione ingrasso dell'impianto. In questa roggia sono presenti diverse specie ittiche come *Cyprinus carpio*, *Ctenopharyngodon idella*, *Alburnus alburnella* e altri ciprinidi; *Silurus glanis*, *Perca fluviatilis*, *Esox lucius*.
- 2) un bacino di risorgiva di piccole dimensioni (nessuna informazione sugli organismi presenti).

L'acqua di entrambe le sorgenti si mescolava in un sistema di tubazioni in proporzioni pressoché uguali (50% dalla roggia e 50% dalla risorgiva) ed entrava in av.2 senza condizionamento di temperatura né trattamenti di sanificazione. Gli storioni sono stati inizialmente distribuiti in 18 delle 26 vasche e a partire dal 24/08/2021 sono stati ridistribuiti in tutte le 26 vasche, occupando così l'intera avannotteria 2 per diminuire la densità in vasca.

In questo periodo i giovanili non sono più stati manipolati fino al 18/11/2021, data in cui in seguito ad una selezione, i soggetti di maggiori dimensioni sono stati trasferiti nella sezione del pre-ingrasso. Lo spostamento definitivo di tutti gli esemplari nelle vasche del pre-ingrasso è avvenuto in data 01/02/2022. L'impianto in questione era a ciclo aperto. I ricambi idrici erano sufficienti a mantenere condizioni di allevamento ottimali (O₂ saturo al 70%, pH: 8, NH₄, NO₂⁻, NO₃⁻ : in concentrazioni trascurabili).

Le condizioni di alimentazione erano le stesse per tutte le vasche: alimento artificiale estruso in percentuale proporzionata alla biomassa della vasca, al metabolismo dei pesci (temperatura dell'acqua) e allo stadio vitale dei pesci (i giovanili tendono ad accrescersi molto rapidamente nel primo anno di vita). L'alimento è stato somministrato manualmente.

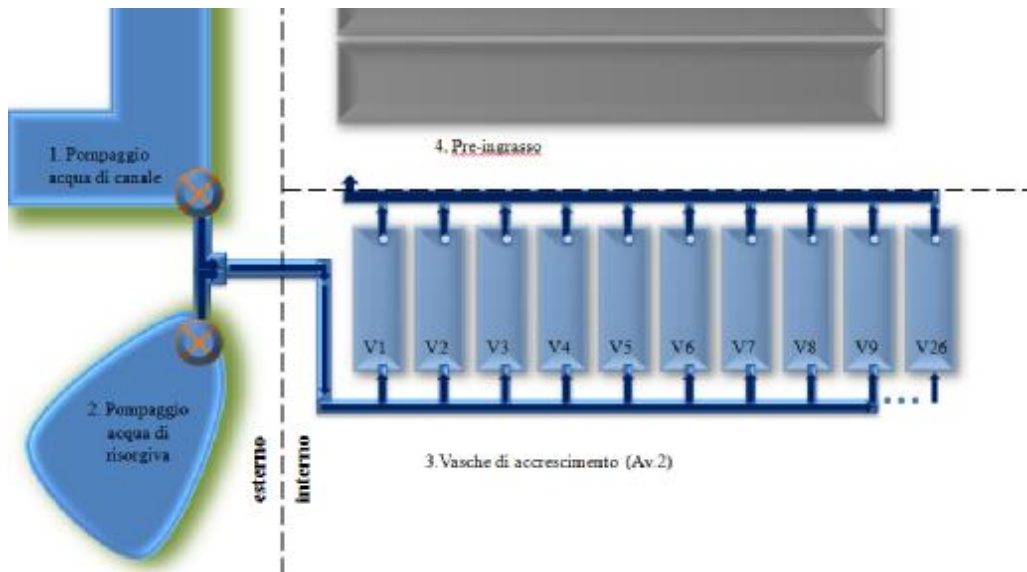


Figura 12: mappa schematica del complesso di accrescimento “avannotteria 2” (Av.2)



Figura 13: foto satellitare del complesso di av.2 (capannone rettangolare grigio). In rosso sono numerate due sorgenti da cui viene prelevata acqua tramite le pompe.

3. Materiali e metodi

3.1 Campionamento

Il campionamento è stato effettuato in sede di allevamento con lo scopo di eseguire: esame istologico, esame virologico, esame batteriologico. Sono stati campionati totalmente 105 individui.

3.1.1 Campionamento per istologia

Per l'esame istologico sono stati prelevati alcuni soggetti precedentemente all'episodio di mortalità (16) e alcuni soggetti durante la fase acuta della malattia (7). Questi campioni sono stati raccolti in sede di av.2. I campionamenti sono stati effettuati in 4 date: 27/07/2021; 05/08/2021; 31/08/2021; 28/09/2021. L'eutanasia è stata praticata tramite overdose di anestetico (MS-222) tricaina metansulfonato. Gli individui sono stati raccolti in un numero di volta in volta proporzionale alle dimensioni dei soggetti (minori le dimensioni, maggiore il numero dei soggetti campionati).

3.1.2 Campionamento per ricerca virale

Gli esemplari di *A. gueldenstaedtii* destinati alla rilevazione di DNA di AcIV-E sono stati complessivamente 76. Rispettivamente in 7 date di campionamento sono stati prelevati: 18 individui (05/08/2021); 18 individui (12/08/2021); 9 individui (02/09/2021); 9 individui (16/09/2021); 9 individui (12/10/2021); 9 individui (18/11/2021); 4 individui (18/02/2021). Il campionamento per gli esami virologici è sempre stato effettuato dalla vasca 1 alla vasca 9, nell'impossibilità di analizzare tutte e 26 le vasche. Tali vasche verranno da qui in seguito denominate "vasche campione".

Questi sono stati eutanassati seguendo le stesse modalità utilizzate per i soggetti destinati all'esame istologico e sono poi stati sezionati a fresco utilizzando strumentazione disinfettata con ipoclorito tra un esemplare e l'altro, per ottenere porzioni degli organi target della ricerca virale. Gli organi designati per le analisi virologiche sono stati sezioni di branchie e sezioni di disco orale e barbigli, considerati sede d'elezione di AcIV-E (Ciulli et al., 2017), fissati in etanolo 90% in provette Falcon. Le Falcon sono state poi chiuse con parafilm ed identificate con l'iniziale dell'organo target (B = branchie o D = disco orale + barbigli), seguite dal numero di vasca (1-9) e conservate a temperatura ambiente. Da ogni campionamento fatta eccezione per l'ultimo si sono sempre ottenute 18 falcon (B1-B9 e D1-D9). I campioni sono stati trasportati entro 48 ore all'IZSVE per le successive analisi biomolecolari.

3.1.3 Campionamento ambientale per rilevare DNA di AcIV-E all'interno del mezzo acquoso

Si suppone che l'acqua sia il mezzo di trasmissione orizzontale della carica virale. È stato prelevato un litro di acqua da ogni vasca campione (v1-v9). Per verificare se e in che quantità il DNA virale fosse presente e identificabile nel mezzo acquoso nelle varie date di campionamento, il campione d'acqua è stato prelevato in corrispondenza dello scarico di ogni vasca e conservato in bottiglie di plastica. L'acqua delle vasche è stata campionata in queste 4 date: 27/07/2021; 05/08/2021; 02/09/2021; 16/09/2021.

3.1.4 Campionamento ambientale per rilevare DNA di AcIV-E nel muco

Uno dei primi segni clinici descritti in seguito alla confermata presenza di infezione virale da AcIV-E è l'iperproduzione di muco. In seguito al riscontro di aumentata produzione di muco nei soggetti in osservazione, che era possibile notare accumulato in bolle sulla superficie dell'acqua, sono stati effettuati dei prelievi di muco. Il muco è stato raccolto mediante un filtro a rete di nylon con maglia da 180 micron e in seguito trasferito in provette Eppendorf da 15 ml contenenti 5 ml di acqua della vasca. Il prelievo è stato effettuato in un'unica soluzione il giorno 14/09/2021 dalle vasche 19 e 24, refrigerato e conferito entro 48 ore all'IZSVe.

3.1.5 Campionamento per esami batteriologici

Per gli esami batteriologici sono stati prelevati complessivamente 6 soggetti. Sono stati campionati 3 soggetti in data 11/08/2021 e 3 in data 01/09/2021 per verificare l'eventuale presenza di patogeni batterici. Per l'esame batteriologico sono stati scelti giovanili con segni clinici evidenti: iper-insufflazione della vescica natatoria, atassia natatoria e lesioni esterne come erosioni o ulcere cutanee. I soggetti sono stati eutanasizzati in impianto come descritto in precedenza e trasportati refrigerati presso il laboratorio IZSVe.

3.2 Realizzazione di preparati istologici

Dopo il campionamento (paragrafo 3.1.1) la fase successiva è stata la lavorazione dei campioni (figura 14) per l'osservazione al microscopio ottico.

Ai soggetti destinati all'esame istologico è stato praticato un taglio longitudinale nella parte ventrale in modo tale da poter fissare gli organi interni, in seguito gli individui sono stati fissati in toto in formalina in rapporto volumetrico di 1:10 e conservati sotto cappa aspirante all'interno dei loro contenitori appositamente contrassegnati con il numero della vasca dalla quale sono stati raccolti e con la rispettiva data di campionamento.

Sotto cappa aspirante i campioni, sono stati estratti per mezzo di pinze dai loro contenitori e sono state realizzate sezioni dei diversi tessuti e organi tramite forbici e bisturi. Gli storioni più piccoli sono stati ridotti in due porzioni lungo il loro asse di simmetria bilaterale. Ognuna delle due metà è stata posizionata intera all'interno della biocassetta, eliminando parte del rostro e il peduncolo caudale a partire dall'apertura anale. Nei soggetti di maggiori dimensioni, gli organi analizzati sono stati: sezione trasversale di rostro che comprendesse una parte di barbigli e cute del disco orale, branchie, cuore, fegato, pancreas, stomaco, intestino, milza, cervello e rene. Queste sezioni di tessuti e organi sono state quindi posizionate all'interno di biocassette insieme ad una sottile sezione di spugna sintetica imbevuta di formalina in modo da mantenere in posizione le sezioni all'interno della biocassetta e in modo da mantenerle fissate prima delle successive operazioni.

Gli organi contenuti nelle biocassette sono stati poi disidratati mediante numerosi passaggi crescenti in alcool etilico, seguiti da xilene e passaggio in paraffina liquida, all'interno di un processatore Leica ASP 300. Gli organi in seguito sono stati inclusi in paraffina tramite una centralina di inclusione Bio-optica e conservato in freezer ad una temperatura di -25°C. La bassa temperatura del blocchetto consente la realizzazione di una sezione priva di difetti.

I blocchetti di paraffina, previa sgrossatura, sono stati sottoposti al taglio al microtomo (Leica RM 2145) con sezioni di 4 micron. Le sezioni immerse in bagnomaria a temperatura di 36 °C sono state raccolte, una volta distese, tramite spatola e pennello e posizionate sopra un vetrino porta oggetto.

I vetrini sono stati sottoposti ad un trattamento in stufa a 70°C per 30 minuti e infine spostati all'interno di un coloratore automatico (Leica Autostainer XL) per l'ultimo passaggio di colorazione con ematossilina/eosina.

I preparati istologici sono stati montati con balsamo (EUKITT) come ultima fase prima della osservazione al microscopio ottico.

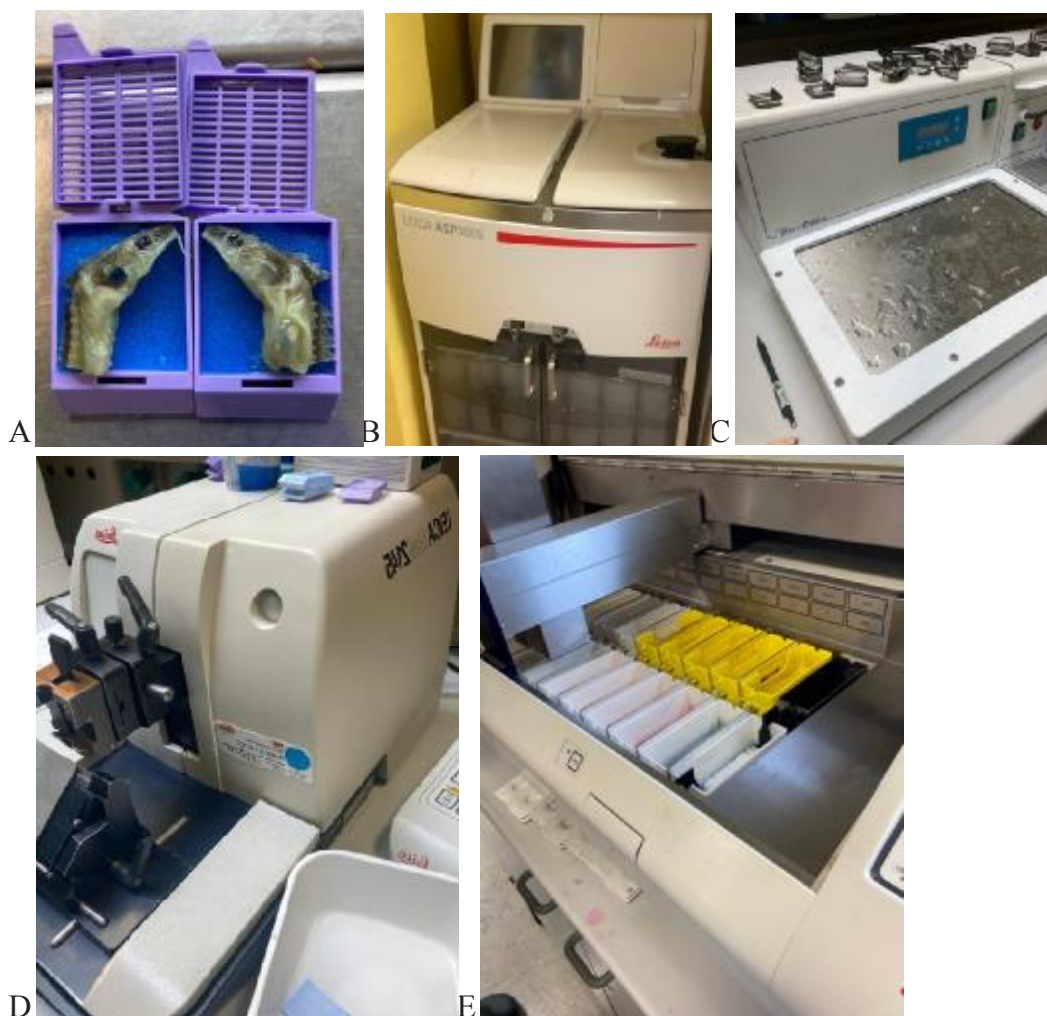


Figura 14: A) Porzione parasagittale di giovanili in biocassette del 27/07/2022 precedentemente all'inclusione e alla realizzazione dei vetrini istologici. B) processatore. C) Centralina di inclusione. D) Microtomo. E) Coloratore automatico con il carrello dei vetrini durante l'ultimo passaggio in xilene.

3.3 Rilevazione del DNA di AcIV-E

3.3.2 Filtraggio dei campioni di acqua

All'arrivo in laboratorio, l'acqua di ogni vasca è stata filtrata singolarmente fino alla completa ostruzione del filtro, tramite un sistema filtrante, utilizzando un filtro sterile di nitrocellulosa ($\varnothing = 47$ mm) con porosità da $0.45 \mu\text{m}$ (Sartorius Stedim Biotech) ed azionato tramite una pompa a vuoto. I filtri sono stati conservati in provette Falcon da 15ml in congelatore (-80°C) fino all'isolamento

del materiale genetico. L'estrazione del DNA è stata eseguita con il metodo descritto da Doyle e Doyle (1987), il quale prevede l'utilizzo di bromuro di cetiltrimetilammonio (CTAB), implementando alcune modifiche minori come riportato da Strand et al. (2014, 2019) per migliorare la resa e la qualità dell'estrazione. Gli estratti sono stati poi valutati tramite NanoDrop™ Lite Spectrophotometer (ThermoFisher Scientific), per stimare la concentrazione e la qualità del materiale genetico e successivamente sono stati analizzati con la metodica di Real Time PCR come descritta al punto 3.3.5.

3.3.3 Centrifugazione e concentrazione dei campioni di muco

Nel caso in cui i campioni di muco fossero particolarmente densi e sporchi, sono stati chiarificati tramite centrifugazione per 5 minuti a 4 °C a 1500 rpm. I surnatanti sono stati quindi concentrati mediante l'uso di membrane selettive "Centrifugal filter Units Amicon® Ultra-15" mediante centrifugazione a 4000 rpm per 10 minuti. Tali filtri si basano su membrane selettive che separano i componenti di campioni biologici e ambientali in base al peso molecolare. Partendo da un volume iniziale di 10 ml di acqua e dopo aver sciacquato il filtro, sono stati ottenuti circa 700 microlitri di campione concentrato.

Da questi 700 microlitri è stata effettuata la Real time PCR come descritto al paragrafo 3.3.5 e l'osservazione al microscopio elettronico a trasmissione (TEM) come descritto al paragrafo 3.3.4.

3.3.4. Microscopia elettronica a trasmissione

Per l'osservazione al TEM il campione (circa 150 microlitri) è stato posto su griglie di rame rivestite in carbonio-Formvar, ultracentrifugato a 20 psi (125000 rpm) per 15 minuti in una Beckman Airfuge, usando un rotore A-100, colorato con una soluzione all'1% di acido fosfotungstico, e infine predisposto per l'osservazione con il TEM Philips 208 S funzionante a 80 kV, a 19000-45000 ingrandimenti.

3.3.5 Real Time PCR per la rilevazione del DNA di AcIV-E

La real time PCR per la rilevazione del DNA di AcIV-E utilizzata nel presente studio è basata sul protocollo sviluppato e descritto da Bigarrè et al. 2017. Il target della metodica è un frammento di 99 bp del gene codificante per major capsid protein (MCP).

Per la preparazione del campione sono state utilizzate forbici e pinze sterili. Dopo la rimozione degli organi dall'etanolo, sono stati campionati 150-200 mg di

tessuto che sono stati poi sottoposti ad omogenizzazione con l'aggiunta di sabbia sterile mediante mortaio e pestello sterili. All'omogenato d'organo sono stati aggiunti 1/3 peso volume di PBS sterile (circa 450-600 µl), raccolti in una provetta e chiarificati mediante centrifugazione (5 minuti a 4 °C a 1500 rpm).

Sono stati poi prelevati 250 µL di surnatante ed aggiunti nel buffer di lysis in dotazione nel kit QIASymphony® DSP Virus/Pathogen Midi Kit utilizzato anche per le successive fasi di estrazione del DNA virale mediante estrattore automatico QIASYMPHONY SP.

Per l'amplificazione e l'esecuzione della real time, sono stati utilizzati 5 microlitri di RNA estratto e 20 microlitri di mastermix, preparata secondo le specifiche dettagliate in tabella 2, per un volume finale di reazione pari a 25 microlitri per campione.

Per ogni corsa, oltre ai campioni in esame sono stati inclusi i seguenti controlli:

- 1) Controllo negativo di estrazione
- 2) Controllo negativo di amplificazione
- 3) Controllo positivo

La reazione di real time PCR è stata effettuata in piastre da 96 pozzetti su termociclatore CFX96 Bio-Rad impostando il profilo termico indicato in tabella 3. Al termine della reazione di amplificazione i dati sono stati elaborati dal manager software "CFX96 Software".

REAGENTE	CONCENTRAZIONE INIZIALE	CONCENTRAZIONE FINALE	µl x 1 REAZIONE
Acqua bidistillata sterile	/	/	5.125
Primers oPVP346	10 µM	400 nM	1
Primers oPVP347	10 µM	400 nM	1
PCR Buffer	2X	1X	12.5
Sonda FAM qPVP20	6µM	90 nM	0.375
Volume totale mix	Vortexare la mix per pochi secondi e centrifugare brevemente, distribuirli in volumi di 20 µL in provette per PCR da 0,2 mL		20
DNA	Aggiungere il DNA nelle rispettive provette		5
Volume finale			25

Tabella 2. Preparazione della mastermix per rPCR (CFX96 Bio-Rad).

FASE	TEMPERATURA/TEMPO	N. cicli
DENATURAZIONE INIZIALE	95°C / 15 min	1
DENATURAZIONE	94°C / 15 sec	40
ANNEALING ESTENSIONE	60°C / 60 sec*	

Tabella 3: Parametri per la reazione di rPCR (CFX96 Bio-Rad).

Stante la buona riuscita di tutti i controlli, il campione in esame è stato definito come positivo quando si è osservato un incremento regolare della fluorescenza associato ad un valore di cicli soglia (Ct) compreso tra 8 e 35 cicli soglia.

Il campione è stato definito dubbio quando si è osservato un incremento regolare ma debole della fluorescenza associato ad un valore Ct compreso tra 36 e 40 cicli soglia.

Infine il campione è stato definito negativo quando non si è rilevato un aumento di fluorescenza o con Ct \geq di 40.

3.3.6 Sequenziamento e analisi filogenetica

Su uno dei campioni positivi alla real time PCR, è stata applicata la metodica PCR end point utilizzando le coppie di primers denominate Segmento A e segmento B del gene MCP (figura 15) secondo l'articolo di Bigarrè et al. (2017) per il suo successivo sequenziamento.



Figura 15: sequenza e mappatura degli oligonucleotidi usati nello studio di Bigarrè et al. (2017).

La PCR è stata eseguita secondo il seguente protocollo:

REAGENTE	CONCENTRAZIONE FINALE	$\mu\text{l} \times 1$ REAZIONE
Acqua ultrapura sterile	/	10
10X PCR Buffer (Platinum Taq DNA Polymerase Kit Invitrogen cod. 10966-034)	1X	2.5
MgCl ₂ 50 mM (Platinum Taq DNA Polymerase Kit Invitrogen cod. 10966-034)	1,5 mM	0.75
dNTPs mix 10 mM (High Capacity cDNA Reverse Transcription kit Applera cod. 4368814)	0.2 mM	0.5
Primers: 10 μM pPVP339: 5'-GATAGGGTACAAGAGACATTC-3'	0.8 μM	2
pPVP341: 5'-ACAAGCAAGAATATTTGGTTG-3'		
Primers: 10 μM pPVP340: 5'-TCAACCAAATATTCTTGCTTG-3'	0.8 μM	2
pPVP344: 5'-GCACTTCCAGAAGGTTGGTG 3'		
Platinum Taq 5 U/ μl (Platinum Taq DNA Polymerase Kit Invitrogen cod. 10966-034)	1.25 U	0.25
VOLUME TOTALE		20
VOLUME CAMPIONE DNA		7
VOLUME FINALE DI REAZIONE		25

Tabella 4: Preparazione della mastermix per PCR (Bio-rad Mycycler).

FASE	TEMPERATURA/TEMPO	N. cicli
ATTIVAZIONE TAQ POLIMERASI	95°C / 5 min	1
DENATURAZIONE	94 °C/30 sec	40
ANNEALING ESTENSIONE	53°-72°C/ 30 sec	40
ELONGAZIONE FINALE	72° c/ 7 min	1

Tabella 5: Parametri per la reazione di PCR (Bio-rad Mycycler).

L'amplificato è poi infine inviato al sequenziamento mediante metodica Sanger. Per l'analisi filogenetica, effettuata con il programma MEGA X con il metodo Maximum likelihood (ML), è stata preso come riferimento l'albero filogenetico presente nel lavoro di Bigarré (2017) dove gli autori hanno allineato sequenze parziali di MCP derivanti da diversi iridovirus compresi quelli da storioni europei e americani. Inoltre, sono stati inclusi anche altri virus a DNA, diversi da sNCLDV, come radice dell'albero.

3.4 Esecuzione di esami batteriologici

Campioni da rene cefalico, milza ed encefalo sono stati prelevati con anse sterili e seminati su terreni agarizzati: Agar Sangue e Enriched Anacker-Ordal Agar (AOAE), e stemperati in brodo Tryptone Soy Broth (TSB). I terreni sono stati mantenuti a 22°C e valutati a 24-96 ore per evidenziare la crescita di batteri con differente morfologia. Singole colonie di microrganismi sono state isolate e tipizzate mediante: prove biochimiche routinarie (ossidasi, catalasi, test KOH, morfologia e mobilità a vetrino, metabolismo su terreno O/F, KIA, SIM, esulina,

sensibilità alla clindamicina), analisi in galleria miniaturizzata API RAPID 32 ID STREP o API 20E (bioMérieux) e valutazione del profilo proteico, mediante spettrometria di massa Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight (MALDI-TOF) tramite MALDI Biotyper® (Bruker).

4. Risultati

4.1 Segni clinici

Il 16/07 è la data in cui tutti i pesci sono stati spostati dal complesso di svezzamento (av.1) al complesso di av.2. Secondo dati anamnestici dei titolari dell'azienda, in av.1 non si sono mai evidenziati episodi di mortalità consistenti. Prima del trasferimento la mortalità media giornaliera dei giovanili di storione nelle vasche era pari allo 0,004% (trascurabile, e da considerarsi evento previsto, data l'elevata sensibilità degli esemplari in questo stadio vitale). Le mortalità associate ad un probabile e sospettato virus si sono sempre osservate in av.2. Dopo il trasferimento, i primi segni clinici (figura 16), comparsi a fine agosto 2021, sono stati:

- letargia e nuoto in superficie
- inappetenza
- iperventilazione
- iperproduzione di muco.

Dopo qualche giorno dalla comparsa dei primi sintomi si è assistito ai primi episodi di mortalità. Nel lungo periodo (settimane) si notava una progressiva differenza nel comportamento e nella morfologia tra i soggetti infetti e quelli sani. Alcuni soggetti mostravano: alterazioni del nuoto con movimento circolare in superficie (“looping”) accompagnato in alcuni casi da rigonfiamento addominale per iper insufflazione della vescica natatoria; pallore della livrea; ulcere cutanee; necrosi e anemia branchiale (figura 17). Pur non essendo stati effettuati rilievi ponderali sugli storioni in questo periodo, si osservava evidente dimagrimento nei soggetti sintomatici. La malattia non si presentava contemporaneamente in tutte le vasche, ma con cronologia differente tra fine agosto e fine settembre (tabella 6). Il conto della mortalità per vasca è stato effettuato giornalmente.

Data osservazione segni clinici	Vasche
30/08/2021	9; 24
06/09/2021	4
15/09/2021	19; 20
16/09/2021	14; 15; 23
21/09/2021	1; 6; 7; 11; 15
23/09/2021	13; 16; 21; 25
24/09/2021	18
28/09/2021	5; 8; 17; 22
29/09/2021	2; 3; 10; 12
30/09/2021	26

Tabella 6: andamento temporale della mortalità per vasca (nell'arco di 30 giorni tutte le vasche esibivano segni clinici).



Figura 16: A) soggetti sintomatici in vasca, inappetenti da parecchi giorni, livrea pallida, bolle di muco sulla superficie della vasca. B) confronto tra due vasche: in alto assenza di malattia e muco e in basso presenza di malattia con muco in superficie dell'acqua.



Figura 17: necrosi e anemia branchiale.

Nell'arco di 25-30 giorni di tempo in ogni vasca si è potuto assistere in sequenza a: inizio della sintomatologia, mortalità e scomparsa dei sintomi. Al giorno 05/11/2021 tutti gli storioni erano asintomatici. All'inizio del mese di novembre era possibile notare una netta differenza nelle dimensioni di alcuni soggetti rispetto ad altri.

4.2 Mortalità nel tempo di av.2

Il tasso di mortalità delle 26 vasche di av.2 è stato rilevato nel periodo compreso tra il 24/08/2021 e il 18/11/2021. Il 24/08/2021 i giovanili di *A. gueldenstaedtii* stabulati erano 11951. Il 18/11 i giovanili morti erano complessivamente 1906 (grafico 4). La mortalità complessiva è stata del 15,9% in questi 87 giorni (circa 3 mesi). Un andamento simile della mortalità cumulativa in questo arco temporale di riferimento si è riscontrato all'interno delle 9 vasche campione (vedi campionamento paragrafo 3.3.1) v1-v9 con 568 esemplari morti su 3508 storioni totali il 24/08. La mortalità complessiva delle vasche campione è stata del 16,1% ed è visibile nel grafico 5.

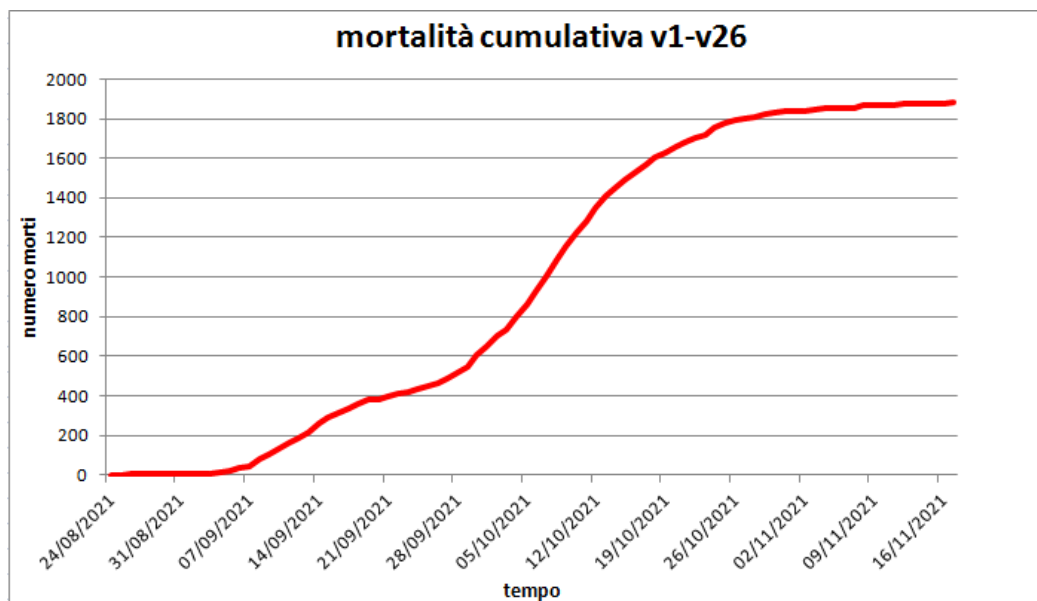


Grafico 4: andamento della mortalità cumulativa di tutte le vasche di av.2 (v1-v26) dal 24/08 fino al18/11.

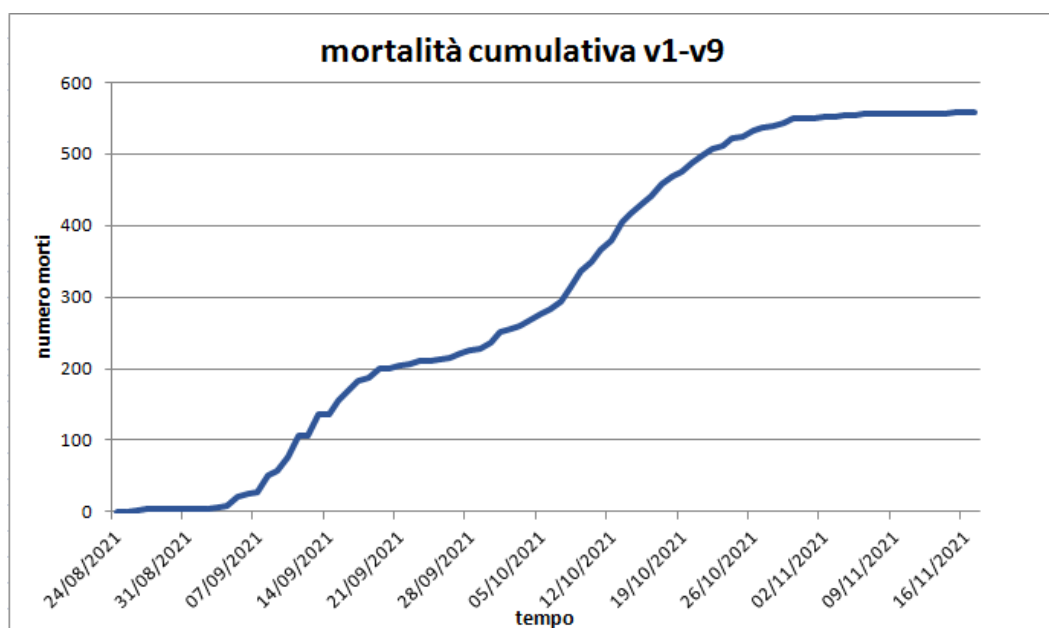


Grafico 5: andamento della mortalità cumulativa delle vasche campione (v1-v9) nello stesso intervallo di tempo.

Registrando il numero di morti per ogni vasca giornalmente si è potuto costruire anche dei grafici di mortalità giornaliera degli individui riferendoci al medesimo arco temporale (grafici 6,7).

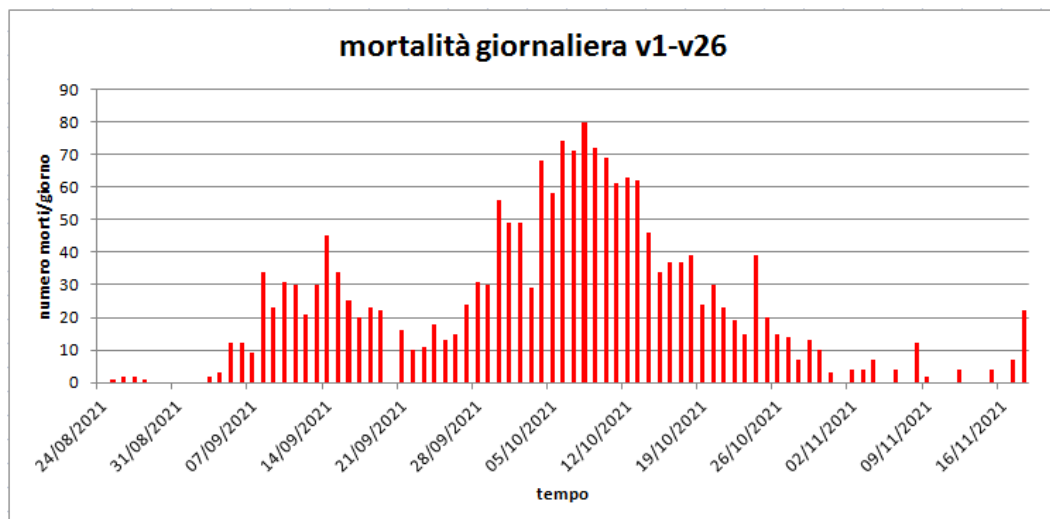


Grafico 6: numero di storioni che giornalmente morivano considerando complessivamente av.2 (v1-v26). Il picco massimo di mortalità è stato registrato il giorno 08/10/2021 con 80 morti.

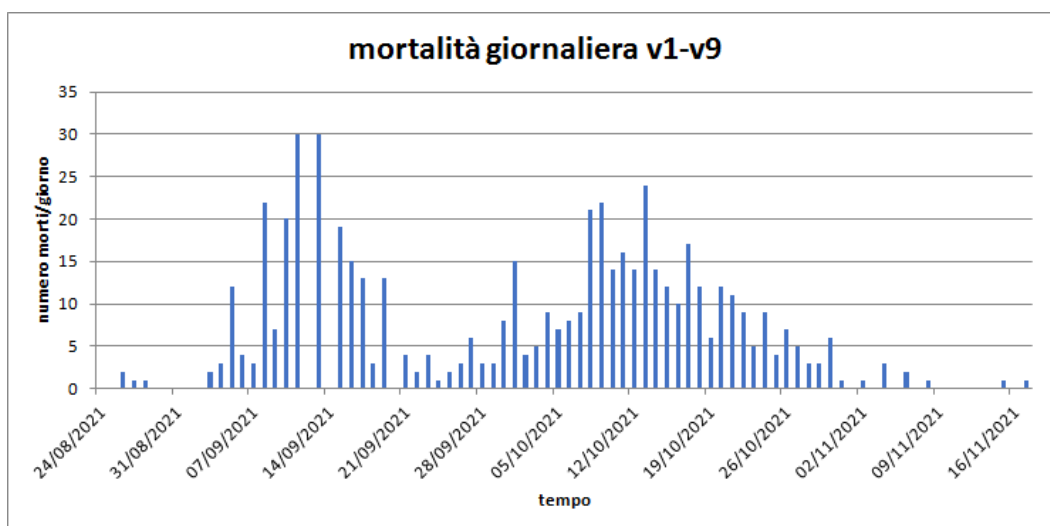


Grafico 7: numero di storioni che giornalmente morivano considerando le vasche campione (v1-v9). Il picchi massimi di mortalità sono stati registrati i giorni 10/09/2021 e 13/09/2021 con 30 morti ognuno di questi due giorni.

L'acqua provenendo dalle stesse sorgenti e da un unico tubo principale, presentava la stessa temperatura in tutte e 26 le vasche. La temperatura è stata rilevata con termometro giornalmente alle ore 08:00 (Grafico 8). La temperatura media delle vasche di av.2 per ogni mese è stata la seguente: $22,6 \pm 0,25$ °C ad agosto, $22,1 \pm 0,62$ a settembre, $20,1 \pm 0,89$ a ottobre e $16 \pm 0,82$ a novembre. Il picco massimo di temperatura è stato registrato il 02/09 ($23,1^{\circ}\text{C}$) e il minimo il 30/11 ($14,7^{\circ}\text{C}$). Le condizioni di alimentazione erano analoghe per tutte

le vasche (paragrafo 2.7). al manifestarsi dei primi sintomi in vasca, l'alimentazione è stata ridotta quasi totalmente. I soggetti sintomatici erano inappetenti ed era preferibile evitare che eventuale alimento non consumato sul fondo delle vasche si decomponesse, diminuendo la concentrazione in vasca di ossigeno disciolto e aumentando la carica batterica ambientale). Nonostante le condizioni di stabulazione fossero pressochè le stesse per tutte le vasche di av.2, la mortalità non si è ripartita in modo simile tra le varie vasche (grafici 9,10,11,12).

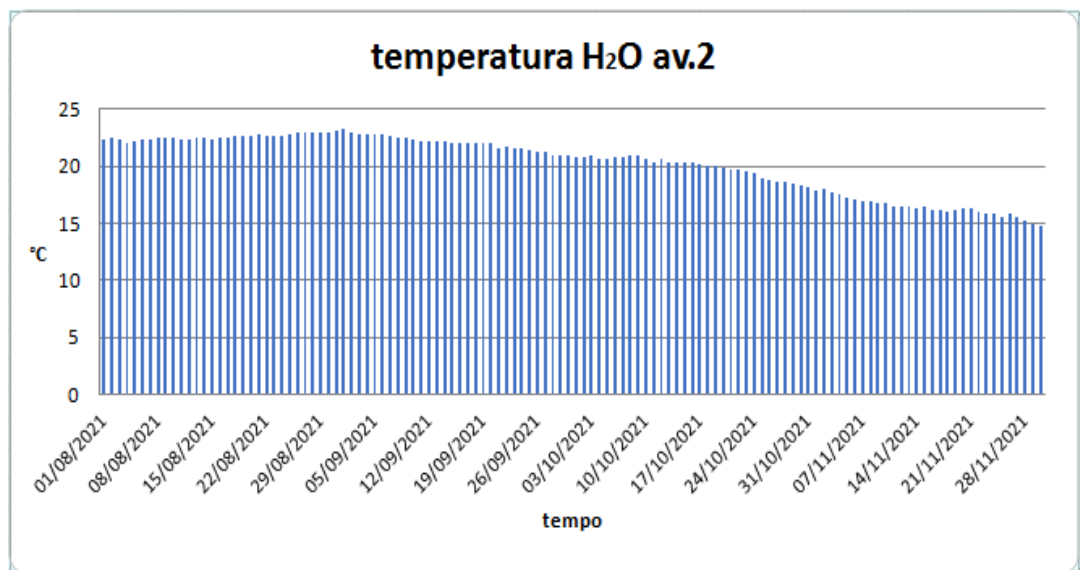


Grafico 8: Andamento della temperatura dell'acqua che alimentava il complesso di av.2 dall' inizio di agosto alla fine di novembre.

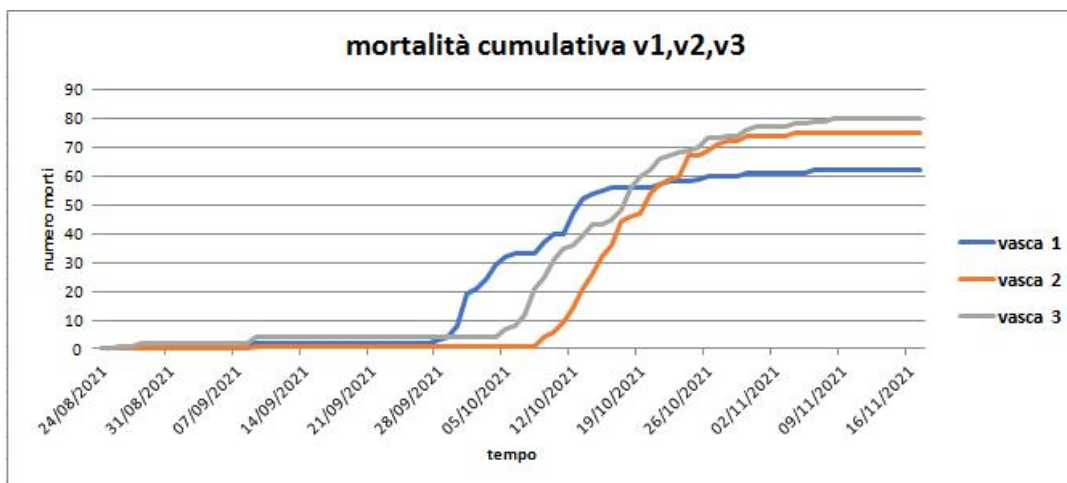


Grafico 9: Andamento della mortalità complessiva dei giovanili in data 18/11: 63 esemplari in vasca 1, 76 esemplari in vasca 2, 81 esemplari in vasca 3 rispettivamente.

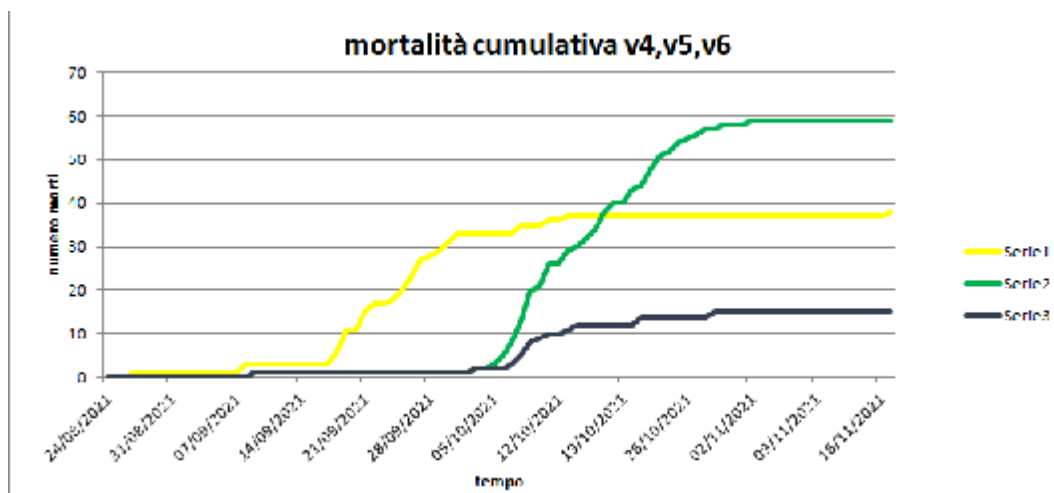


Grafico 10: Andamento della mortalità complessiva dei giovanili in data 18/11: 40 esemplari in vasca 4; 60 esemplari in vasca 5; 16 esemplari in vasca 6 rispettivamente.

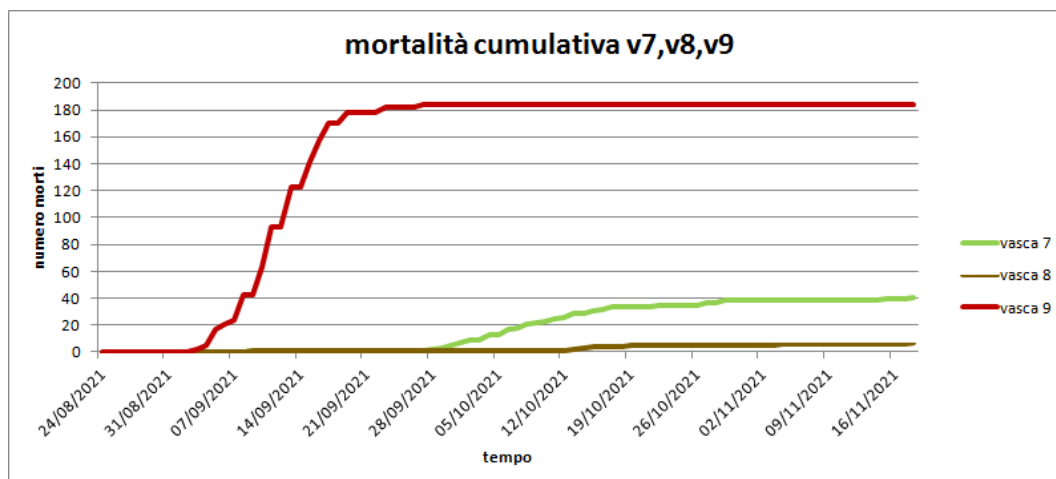


Grafico 11: Andamento della mortalità cumulativa dei giovanili in data 18/11: 41 esemplari in vasca 7; 7 esemplari in vasca 8; 184 esemplari in vasca 9 rispettivamente.

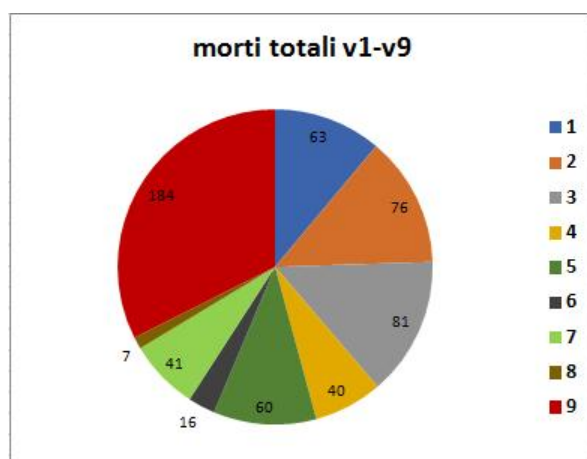


Grafico 12: mortalità complessiva delle vasche in cui sono stati effettuati i campionamenti (1-9). Gli esemplari morti complessivamente sono stati 568. La mortalità in vasca 9 ha rappresentato il 35% del totale.

4.3 Risultati istologici

All'esame istologico i campioni raccolti nel periodo che precedeva le manifestazioni cliniche di malattia non hanno mostrato lesioni evidenti.

I risultati ottenuti dai campioni prelevati in av.2 sono visibili in tabella 7.

L'osservazione istologica di cute della regione cefalica in prossimità della cavità orale e dei barbigli e delle branchie di storioni prelevati durante la fase acuta della malattia presentava citomegalia di alcune cellule epiteliali con nuclei ipertrofici anfofili e citoplasma otticamente assente o vacuolato (figure 18,19).

Nelle ghiandole gastriche dello stomaco dei soggetti infetti si osservavano cellule isolate con nucleo intensamente basofilo a margini stellati (figura 20).

Il rene presentava rarefazione del tessuto linfemopoietico interstiziale e dilatazione dei tubuli renali (figura 21).

Le sezioni istologiche di: cuore, milza, fegato, pancreas, encefalo, intestino non hanno mostrato lesioni evidenti.

Data campionamento	Vasche di riferimento	Numero storioni	Storioni con lesioni istologiche
27/07/2021	1,3,4,5,6, 9	8	No
05/08/2021	5,6,7	8	No
02/09/2021	3,4,6,9	4	Sì ¼
28/09/2021	14,15	3	Sì 3/3

Tabella 7: numero complessivo di campioni istologici in relazione a periodo, vasche e presenza di lesioni.

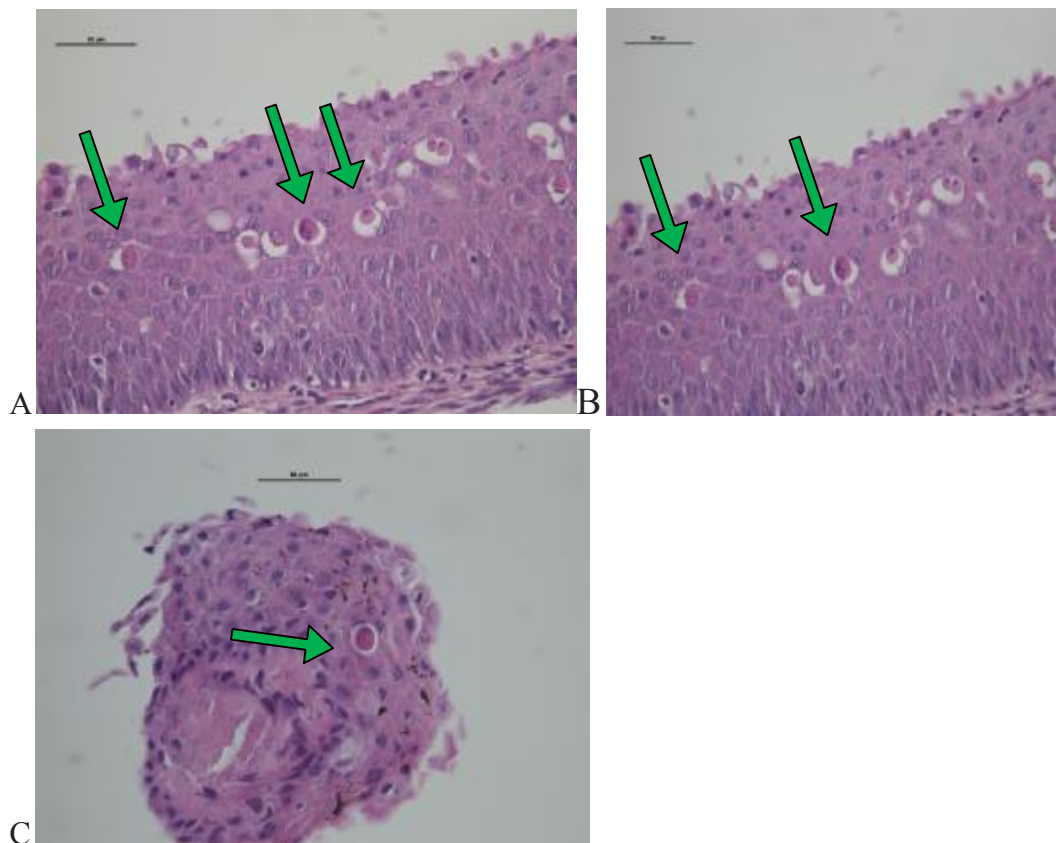


Figura 18: *Acipenser gueldenstaedtii*. Sezioni istologiche di tessuto epidermico della regione periorale (A, B) e del barbiglio (C) colorate con Ematossilina Eosina di avannotto infetto con AcIV-E. Cellule ipertrofiche con nucleo anfofilo (frecche verdi).

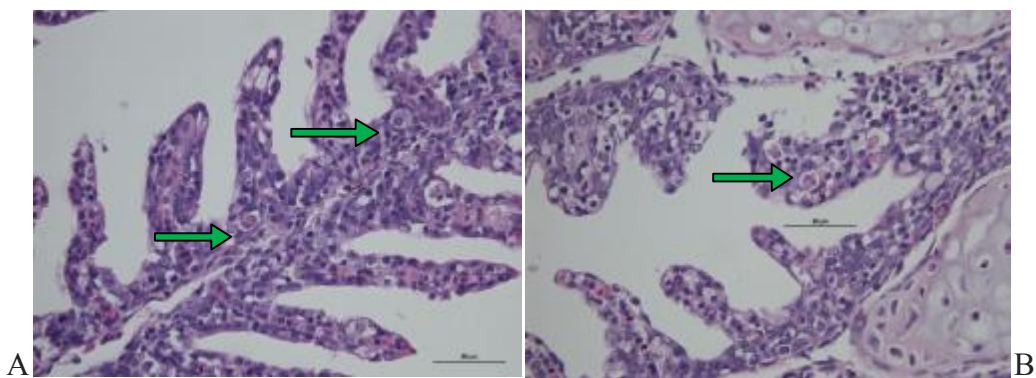


Figura 19: A, B: osservazione microscopica delle branchie di giovanili di *A. gueldenstaedtii* campionati il 28/09. Cellule anfofile (frecche verdi).

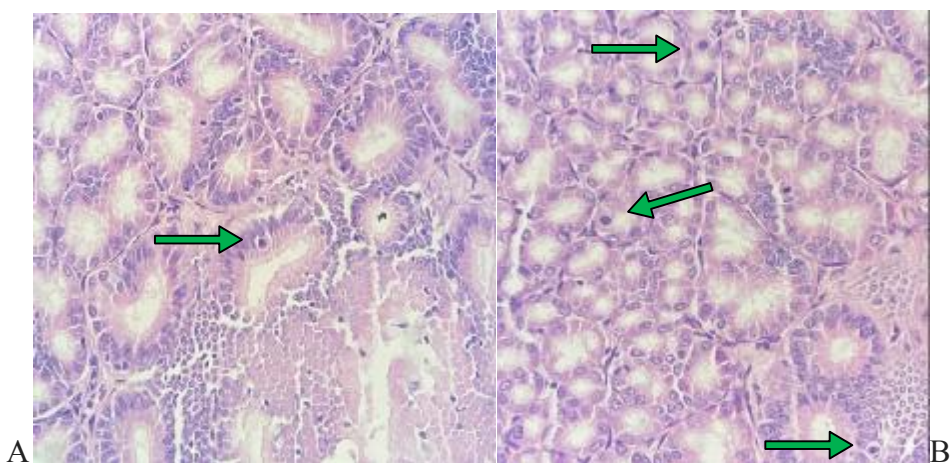


Figura 20: A, B: osservazione microscopica delle ghiandole gastriche di giovanili di *A. gueldenstaedtii* campionati il 28/09; lesioni visibili tramite frecche verdi.

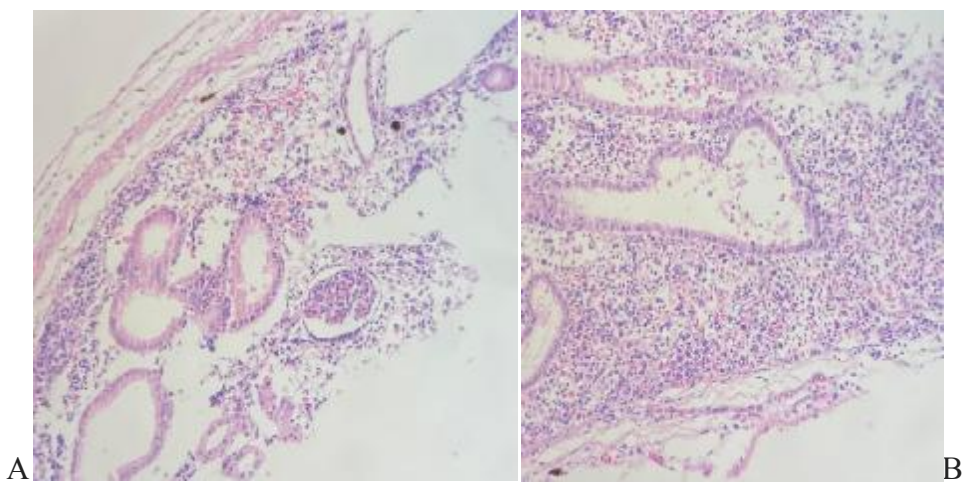


Figura 21: A, B: osservazione istologica di rene di *A. gueldenstaedtii* con rarefazione tessuto linfoemopoietico interstiziale e dilatazione dei tubuli renali.

4.4 Risultato della real time PCR per la rilevazione del DNA di AcIV-E

I campioni per le analisi di rilevazione del DNA di AcIV-E sono stati raccolti con una frequenza media quindicinale dal 05/08/2021 fino al 16/09/2021. Sono stati valutati nel tempo gli andamenti della positività al virus in base ai risultati della real-time PCR che verranno di seguito esposti in base alla data di campionamento (Grafico 13).

-Mese di agosto (campionamenti del 5/08/2021 e 12/08/2021):

in queste date sono stati effettuati i primi campionamenti nelle vasche campione (v1-v9) tra le 18 vasche in cui erano presenti i giovanili nel complesso di av.2. Nessun segno clinico è stato osservato in questo mese, tutti i risultati delle analisi virologiche delle branchie hanno avuto esito negativo; di conseguenza, i dischi orali e i barbigli non sono stati sottoposti al protocollo di real time PCR.

-Mese di settembre (campionamenti del 02/09/2021, 16/09/2021):

in questo mese il campionamento ha rilevato le prime positività. In data 02/09 DNA virale era presente in vasca 9 (come evidenziato dai bassi ct del campione B9). Contemporaneamente si sono rilevati i primi risultati dubbi (B3,B4) con DNA di AcIV-E rilevato dopo molti cicli di PCR (bassa quantità di virioni presenti nelle vasche 3 e 4). Le analisi dei campioni D1-D9 relativi ai dischi orali degli stessi soggetti, sono stati ottenuti risultati molto simili (non mostrati nel grafico); sempre molto positivo il campione D9 relativo alla vasca 9, dubbi i campioni D4,D5. In questa data si sono osservati i primi sintomi in vasca 9 (23,01 ct).

Il 16/09 la maggior parte dei campioni di branchie (6 su 9) nonché tutti i campioni di disco orale e barbigli (non mostrati nel grafico) hanno evidenziato la presenza di DNA virale. I restanti 3 campioni sono risultati dubbi, segno che il virus stava progressivamente infettando tutte le vasche.

-Mese di ottobre (campionamento del 12/10/2021):

la positività è stata riscontrata in tutte le vasche; alla luce dei risultati precedenti i dischi orali e i barbigli non sono stati testati. In questa data i sintomi avevano iniziato a manifestarsi in tutte le vasche.

-Mese di novembre (campionamento del 18/11/2021):

alcuni pool branchiali di soggetti campione (3) sono risultati negativi il 18/02/2022. Anche se a partire dalla prima settimana di novembre le mortalità in vasca erano prossime allo zero e i pesci sopravvissuti erano tornati ad alimentarsi normalmente, il DNA di AcIV-E era ancora molto presente nei campioni analizzati con 6 campioni su 9 ancora positivi e uno dubbio.

-Mese di febbraio (campionamento straordinario del 18/02/2022):

a scopo conoscitivo è stato effettuato un ulteriore prelievo nel mese di febbraio. Questo prelievo ha preso in considerazione esemplari già spostati nella sezione del pre – ingrasso (non più all'interno di av.2). La mortalità era pressochè nulla, pertanto sono stati prelevati solamente 4 campioni per non sacrificare soggetti asintomatici. Il DNA di AcIV-E era ancora presente con due soggetti dubbi su quattro campionati (dati non presentati).

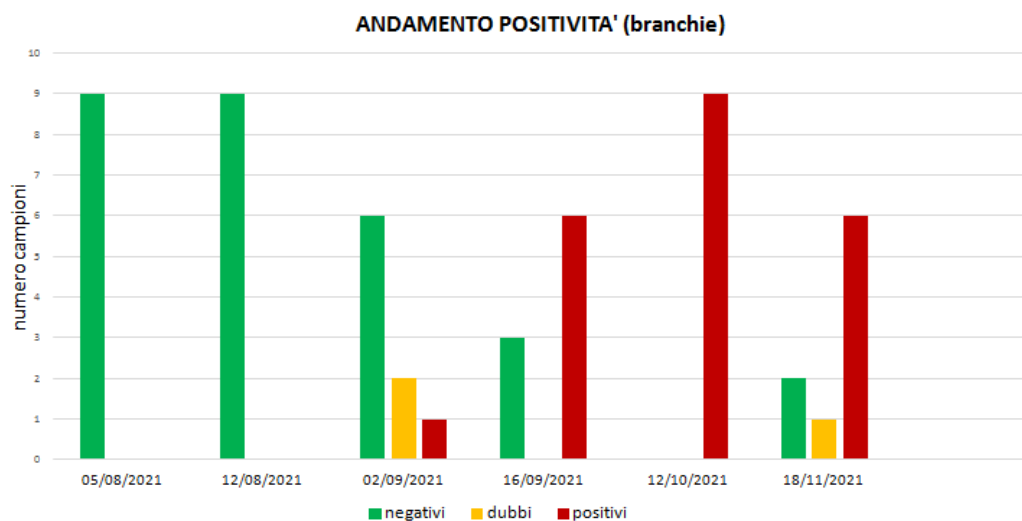


Grafico 13: numero di campioni (branchie) che sono risultati negativi, dubbi o positivi alla real time PCR.

4.5 Risultato del campionamento ambientale per rilevare DNA di AcIV-E all'interno del mezzo acquoso

È stata sottoposta ad analisi solo l'acqua delle vasche i cui pesci sono risultati positivi o dubbi. Nello specifico le analisi relative al campionamento avvenuto il 02/09/2021 hanno mostrato positività in vasca 9, ed esito dubbio nelle vasche 3 e 4, pertanto anche l'acqua relativa allo stesso campionamento è stata testata. Il materiale organico filtrato dalla vasca 9 è risultato nettamente positivo alla real time PCR (23,09 ct). Una seconda analisi ha testato l'acqua campionata il 16/09/2021 presso IZS Ve, rispettivamente delle vasche 3 e 4 risultate dubbie con esiti visibili in tabella 8.

campionamento e analisi per rilevazione di DNA ambientale					
date campionamenti	metodo di analisi	materiale	ID campione	risultato	Ct
02-set	real time PCR	H ₂ O	V3	negativo	
			V4	negativo	
			V9	positivo	23,09
16-set	real time PCR	H ₂ O	V3	negativo	
			V4	positivo	33,73

Tabella 8: risultati delle analisi real time effettuate su campioni di acqua per la rilevazione del genoma virale in campioni non invasivi.

4.6- Microscopia elettronica a trasmissione

Dai campioni di acqua e muco concentrati, è stato possibile osservare mediante TEM alcune particelle virali di morfologia riferibile ad AcIV-E. I virioni apparivano come multistratificati, dalla forma esagonale e coperti da envelope, delle dimensioni di 125-168 nm (figura 22). Le particelle virali sono state osservate singolarmente, dato che non tendevano a formare cluster. Le caratteristiche morfologiche rispecchiano chiaramente quelle dei nucleocytoplasmic large DNA viruses (NCLDV).

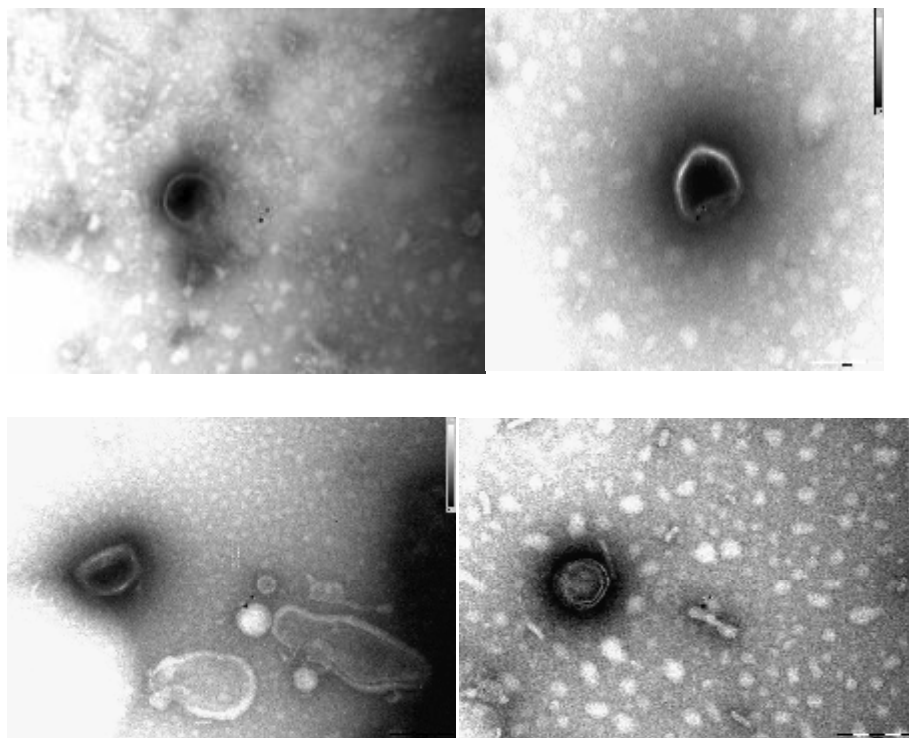


Figura 22: AcIV-E al TEM da campione di muco (71000 ingrandimenti).

4.7 Esami batteriologici

Gli esami batteriologici hanno dato esiti scarsamente significativi per quanto riguarda la presenza di batteri patogeni come evidenziato in tabella 9. Il primo prelievo relativo a metà agosto e precedente al manifestarsi dei primi sintomi, riguardava 3 soggetti che presentavano esclusivamente iper-insufflazione della vescica natatoria e conseguente nuoto circolare in superficie (“looping”). Il secondo prelievo eseguito a metà settembre riguardava 3 soggetti sintomatici della vasca 9. In entrambi i casi è stata rilevata la presenza di ceppi di batteri ubiquitari e con poca rilevanza dal punto di vista della patogenicità. In particolare *A. veronii* è risultato il patogeno più frequentemente riscontrato nei vari organi (rene, milza, cervello) degli esemplari campionati.

esami batteriologici					
numero rapporto	date analisi	metodo di analisi	materiale	ID campione	risultato
V/791	12/08-17/08	esame batteriologico	rene	10	positivo <i>A. veronii</i> , <i>C. freundii</i> , <i>L. lactis</i>
			cervello	11	positivo <i>A. veronii</i> , <i>C. freundii</i> , <i>L. lactis</i>
			milza	12	positivo <i>A. veronii</i> , <i>C. freundii</i> , <i>L. lactis</i>
V/829	01/09-10/09	esame batteriologico	rene	2	negativo
				3	positivo <i>A. veronii</i>
			milza	4	negativo
				5	positivo <i>A. veronii</i>
			cervello	6	negativo
				7	negativo

Tabella 9: Esiti dei rapporti di prova relativi ai test batteriologici.

4.8 Analisi filogenetica

Per costruire l'albero è stata presa come riferimento l'analisi filogenetica effettuata nel lavoro di Bigarré (2017) dove gli autori hanno allineato sequenze parziali di major capsid protein (MCP) derivanti da diversi iridovirus compresi quelli da storioni europei e americani: WSIV, white sturgeon iridovirus (DQ897645); MRSIV, Missouri river sturgeon iridovirus (JX155661); NV, Namao virus (JX155659); BCWSV, British Columbia white sturgeon virus (JX155660) (figura 23). Inoltre, sono stati inclusi anche i seguenti virus a DNA: CodV, cod iridovirus (GenBank accession no. GU391284); PPIV, pike-perch iridovirus (FJ358610); EHNIV, epizootic hematopoietic necrosis virus (AY187045); FVI, frog virus 3 (FVU36913); RBIV, rock bream iridovirus (AY849394); LCDV, lymphocystis disease virus (AY823414); ACMV, *Acanthamoeba castellanii* mamavirus (JF801956.1); CroV, Cafeteria roenbergensis virus (NC014637). La sequenza, della lunghezza di 1360 pb ottenuta nel corso del presente studio è stata identificata con il nome 21ITT/830-9 e corrisponde a un campione relativo alla vasca 9 (in rosso nell'albero). Bigarré et al. (2017) riportano la circolazione di almeno due diversi iridovirus in Europa. Uno simile al Namao virus (NV), mentre gli altri ceppi europei sembrano essere diversi dai ceppi americani (WSIV, MRSIV) e clusterizzano tutti assieme a formare gli European viruses (AcIV-E).

Il campione di interesse, il 21ITT/830-9, oltre ad altri ceppi italiani sequenziati in anni precedenti e inseriti nell'analisi 18ITT/734-5, 20ITT/817-1 e 3 e 20ITT/829 risultano tutti clusterizzare nel gruppo degli iridovirus europei (AcIV-E). Per il tratto sequenziato dell'MCP, gene peraltro molto conservato, tutti gli isolati europei appaiono molto simili.

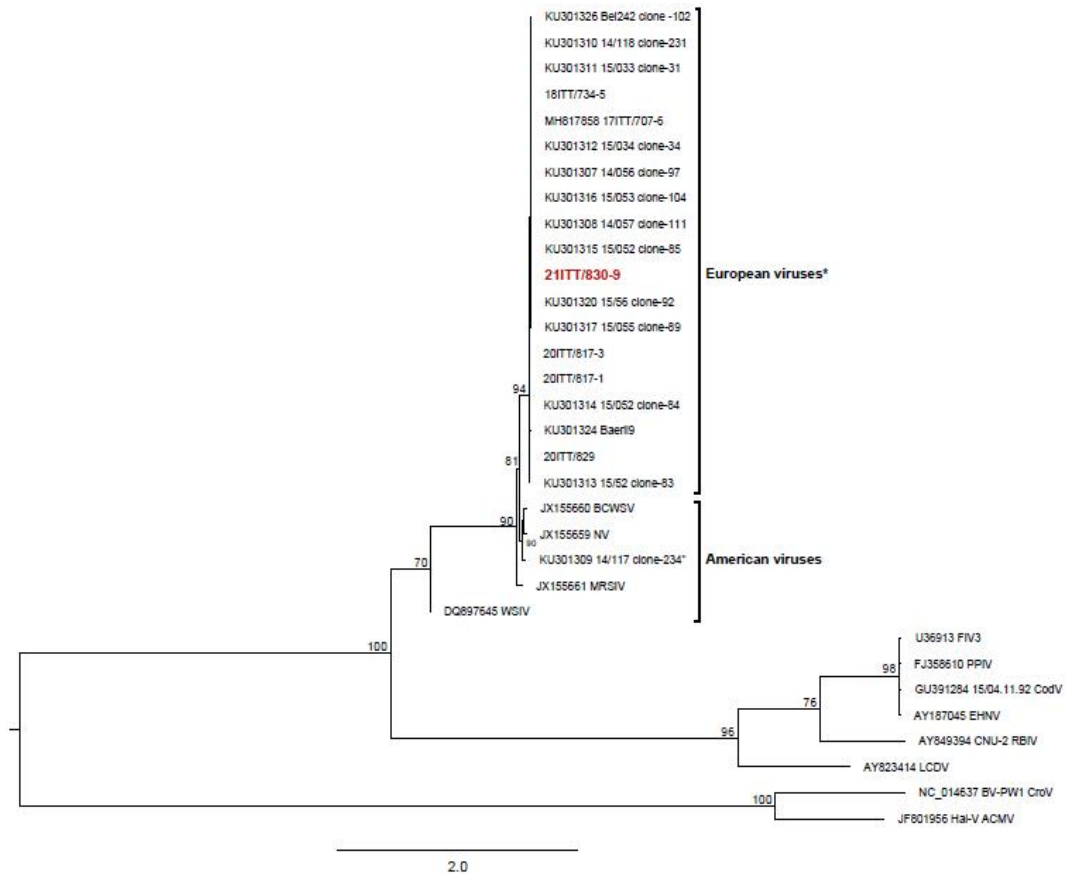


Figura 23: Analisi filogenetica per il campione 21ITT/830-9 (in rosso), ottenuto nel corso del presente studio.

Inoltre, Bigarré (2017) riporta che alcuni campioni AcIV-E possono mostrare eterogeneità genetica in una regione specifica del gene G, con la coesistenza di due sequenze che differiscono di cinque nucleotidi (1+4). Questi nucleotidi sono potenziali marcatori molecolari per differenziare e tracciare la diffusione dei due aplotipi virali attualmente noti.

Nell'immagine dell'elettroferogramma (figura 24) è possibile apprezzare la presenza dei due aplotipi (data dalla presenza dei doppi picchi nella regione identificata da Bigarré (2017)) nei campioni: 17ITT/634-1; 17ITT/707-3; 18ITT/734-5; 20ITT/829; 20ITT/817-1 e 3 circolati in Italia dal 2017 al 2020 rispettivamente, mentre è stato rilevato un solo aplotipo nel campione 21ITT/830-9 oggetto di studio.

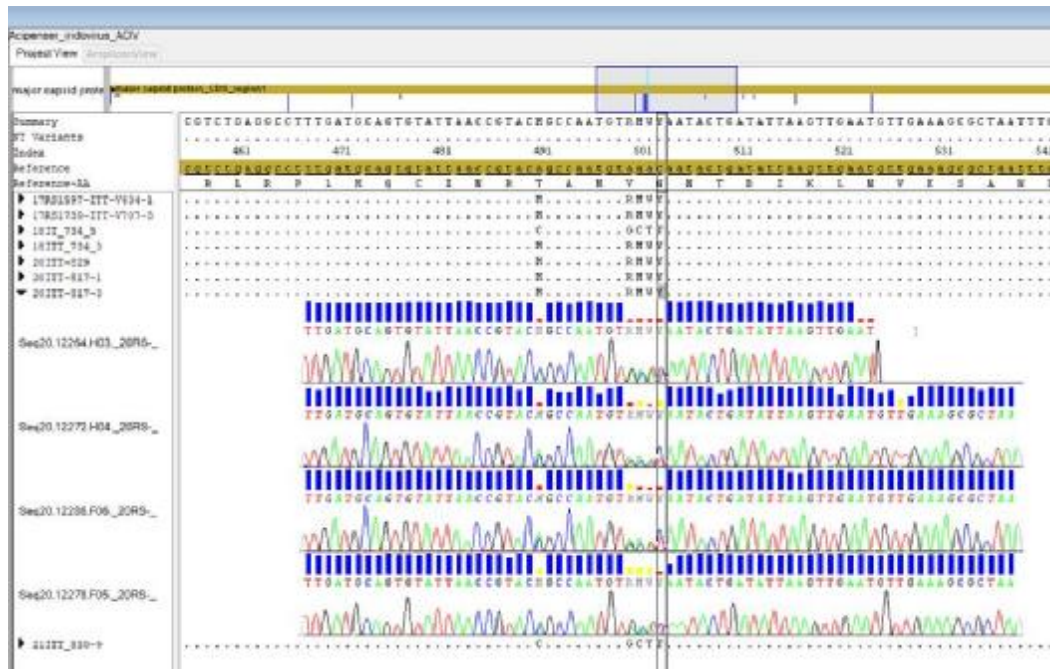


Figura 24: Analisi visiva della sequenza di MCP ottenuta nel corso del presente studio.

5. Discussione

L'allevamento degli storioni sta aumentando in diversi paesi europei, Italia inclusa. L'Italia inoltre è uno dei principali produttori di caviale in Europa.

Episodi di mortalità sono riportati di frequente nel contesto della storionicoltura di tutto il mondo; in particolare le infezioni virali sono la causa delle maggiori perdite di esemplari nel primo anno di vita. I dati della letteratura disponibile suggeriscono che in America la pratica della storionicoltura sia probabilmente iniziata prima che in qualunque paese del mondo. Molti report di mortalità di storioni che hanno avuto eziologia virale provengono infatti dall'America e coinvolgono diversi virus, in particolar modo i NCLDV. AcIV-E risulta essere il NCLDV più presente in Europa ed è particolarmente patogeno per *Acipenser gueldenstaedtii*.

Nel corso del presente studio, per valutare le cause di mortalità ricorrenti di un allevamento commerciale di storioni, sono stati monitorati durante un periodo di 6 mesi (estate/autunno 2021) i soggetti di *Acipenser gueldenstaedtii* allevati in avannotteria 2. I risultati ottenuti ci portano ad affermare che AcIV-E sia la causa principale delle mortalità durante il primo anno di vita.

Ogni malattia dei pesci, nel momento in cui si manifesta in contesto di allevamento significa generalmente che:

- 1) Uno o più fattori abiotici (ambientali) come temperatura, luce, gas disciolti, Ph, durezza, disponibilità di ossigeno, disponibilità di alimento ecc. possono già non rientrare nel range ottimale di tolleranza della specie ittica ospite e quindi alterarne l'omeostasi.
- 2) L'agente eziologico di malattia (patogeno o xenobiotico) è abbastanza pericoloso in quella precisa condizione ambientale da superare le difese e alterare di conseguenza l'omeostasi dell'ospite pesce (Quaglio, comunicazione personale).

Nel nostro caso di studio poiché nessun fattore abiotico è stato riscontrato essere al di fuori della norma, né sono stati rilevati altri agenti infettivi, possiamo concludere che AcIV-E sia un virus particolarmente pericoloso per *Acipenser gueldenstaedtii*. Tale virus avrebbe potuto causare mortalità anche molto più elevate di quella da noi riscontrata durante la nostra indagine se gli allevatori non avessero messo in atto misure gestionali di contenimento della mortalità basate sull'esperienza degli anni precedenti. La mortalità cumulativa in av.2, osservata negli 87 giorni di monitoraggio è ammontata al 15,9 %. Questo dato differisce da quelli riportati in letteratura fino ad ora, dal 30% all'80% (Mugetti et al., 2020). Questo può essere attribuito come già accennato precedentemente al fatto che i titolari e gli operatori dell'allevamento erano preparati all'insorgere di una possibile patologia e di conseguenza alla perdita di alcuni esemplari. Sono state attuate pertanto pratiche preventive di gestione mirate a migliorare il benessere degli storioni (mantenimento di basse densità in vasca, drastica diminuzione dell'alimentazione nelle vasche sintomatiche, pulizia frequente del sistema di pompaggio dell'acqua e delle vasche, rinuncia alla manipolazione frequente dei pesci per misurarne la biomassa). La densità in vasca precedente al 24/08 era 5,56 kg/m³ rispetto al periodo successivo in cui i pesci sono stati suddivisi in 26 vasche. Da questa data in poi, corrispondente alla fase iniziale della malattia, l'accrescimento degli storioni è partito da una densità di 4,18 kg/m³. Se la densità in vasca fosse rimasta quella iniziale e gli esemplari avessero continuato ad accrescersi nelle stesse 18 vasche, probabilmente si sarebbe potuto assistere ad un episodio di mortalità più grave. A conferma di ciò gli allevatori riportano che durante i primi anni di allevamento di questa specie di storione, gli episodi di mortalità avevano avuto entità maggiore. D'altra parte è anche possibile che lo spostamento dei giovanili per suddividerli da 18 a 26 vasche abbia giocato un ruolo negativo sul sistema immunitario dei soggetti provocando momentaneamente uno stress acuto.

Un'altra ipotesi per giustificare questo "basso" tasso di mortalità potrebbe essere la maggior resistenza acquisita dai soggetti selezionatisi naturalmente negli anni. Ulteriori studi sarebbero necessari per confermare o smentire una delle due ipotesi. Dalla curva di mortalità cumulativa delle vasche campione (v1-v9), che ha mostrato un andamento sovrapponibile alla curva di mortalità cumulativa

complessiva (v1-v26), e soprattutto dai grafici di mortalità giornaliera, si può evincere che la patologia abbia esibito una fase acuta nel periodo compreso tra la metà di settembre e la metà di ottobre. La durata complessiva dell'episodio può essere compresa in 60 giorni. La curva di mortalità (v1-v26) ha avuto un andamento bifasico. Le vasche in cui si è assistito ad una mortalità maggiore sono state le vasche 9 e 24, le quali sono state anche le prime ad esibire i sintomi e la mortalità. Abbiamo calcolato grazie ai dati sulla mortalità che durante il primo dei due incrementi della curva (indicativamente dal 7 al 21 settembre) il contributo di queste 2 vasche sia stato considerevole sul totale (l'85% della mortalità totale al 21 settembre era rappresentato da queste due vasche). Probabilmente la malattia è cominciata da queste due vasche causando un primo picco di mortalità per poi diffondersi alle altre causando il secondo picco di mortalità.

La temperatura dell'acqua non ha mostrato variazioni significative nel corso del periodo di monitoraggio. Sebbene nel giorno di osservazione dei primi segni clinici nelle vasche 9 e 24 la temperatura fosse vicina al picco massimo di mortalità registrato in av.2 nel 2021 (22,9 °C), non è stata osservata nessuna correlazione significativa tra temperatura dell'acqua e l'andamento della malattia. La temperatura media dell'acqua durante la fase acuta dell'infezione virale in questo contesto è stata riscontrata essere più alta di quelle riportate in altri studi come ad esempio quello di Bigarrè et al. (2017). Questo dato probabilmente riflette un optimum di temperatura di replicazione più ampio del previsto per questo virus.

Non sono stati osservati segni di malattia in vasca prima del 30/08. Non sono state rilevate lesioni istologiche provenienti dai campioni prelevati prima del 02/09. Non sono stati ottenuti risultati positivi dai saggi di PCR prima del 02/09. Pertanto si può affermare che si è osservata una corrispondenza cronologica tra la data di osservazione dei segni clinici nelle vasche, i risultati dei saggi di PCR (campioni di branchie e dischi orali e acqua) e i risultati istologici.

Dal punto di vista dell'esame istologico, l'anemia branchiale osservata macroscopicamente negli storioni ammalati può risultare conseguente alla rarefazione del tessuto linfemopoietico interstiziale renale osservata a livello istologico.

Inoltre le cellule anfofile degli epitelii peribuccali dei barbigli e delle branchie osservate all'esame istologico sono comuni a molte malattie virali degli acipenseridi.

Gli esami virologici, d'altro canto, confermano la presenza del DNA di AcIV-E con un andamento sovrapponibile a quello delle curve di mortalità giornaliera. Quindi è corretto considerare l'AcIV-E come agente responsabile dei segni clinici e delle lesioni osservate.

Inoltre, il DNA virale è stato riscontrato anche nel campionamento straordinario di metà febbraio (6 mesi dopo l'inizio della sintomatologia), il che suggerisce la

possibilità che AcIV-E, come altri NCLDV, possa rimanere latente all'interno dei soggetti. Questo dato conferma quanto già riportato in letteratura con positività rilevata fino a un anno dopo l'episodio patologico (Ciulli et al., 2016). La replicazione virale potrebbe pertanto riattivarsi in seguito ad eventi immunosoppressivi. Non si può escludere di conseguenza che gli stessi individui che hanno contratto la patologia possano diventare dei portatori una volta raggiunta la maturità sessuale. Anche se al momento non ci sono dati per confermare la trasmissione verticale della malattia.

Il sequenziamento del tratto del gene MCP e la successiva analisi filogenetica confermano l'identità virale e la somiglianza del virus identificato in questo studio con altri AcIV-E europei e italiani. Inoltre la presenza di un solo aplotipo virale nel campione analizzato fa ipotizzare una singola introduzione virale in impianto. Probabilmente l'introduzione è avvenuta con il primo acquisto dell'azienda di esemplari non certificati.

Un risultato di particolare interesse è infine la positività virale rilevata nei campioni di acqua e di muco.

Rilevando tramite i saggi di real time PCR il DNA virale all'interno del mezzo acquoso possiamo confermare che l'acqua è un mezzo di trasmissione orizzontale di infezione. Il campionamento di acqua e muco è particolarmente efficace ed economico, nonché non invasivo e i risultati ottenuti tramite queste matrici sono sostanzialmente sovrapponibili ai campionamenti tradizionali di organi. Per confermare queste affermazioni sarebbe comunque auspicabile aumentare la numerosità campionaria.

Inoltre il campionamento di acqua e di muco ci ha permesso di ottenere delle immagini chiare di AcIV-E al TEM. Le immagini di questo virus in letteratura sono poco frequenti, a causa dell'impossibilità di isolare il virus su coltura cellulare e delle difficoltà oggettive di evidenziare il virus direttamente nei campioni di organo target.

Analizzando nel complesso i risultati possiamo ipotizzare che il fattore principale di rischio per la trasmissione della malattia nell'allevamento oggetto di studio possa essere rappresentato dall'acqua. Non essendo in nessun modo trattata in ingresso ad Av.2, ed essendo in comunicazione a valle dell'allevamento con le acque di scarico, non è escluso che uno o più organismi che vivono nei pressi dell'impianto possano essere di fatto dei vettori di AcIV-E. I mimivirus sono considerati estremamente resistenti ai comuni disinfettanti, in particolare agli alcoli. Partendo dagli studi filogenetici citati in precedenza (paragrafo 2.4.4.4) sappiamo che AcIV-E è un membro della famiglia Mimiviridae. *Acanthamoeba polyphaga mimivirus* (APMV), virus prototipo della famiglia Mimiviridae, è stato dimostrato persistere stabilmente sulle superfici fino a 30 giorni anche in assenza di materiale organico (Campos et al., 2014) e fino a 9 mesi in ambiente acquatico, sia marino che dolce (Dornas et al., 2014). E' pertanto ipotizzabile che anche

AcIV-E sia altrettanto resistente e possa essere diffuso da portatori animati o inanimati.

Ulteriori studi volti ad investigare quale vettore possa aver contribuito alla diffusione di AcIV-E sono pertanto auspicabili.

6. Conclusione

Sicuramente l'osservazione di questo episodio di malattia è stata utile per amplificare le conoscenze sugli NCLDV, nonché una ragione per la quale porsi delle domande ulteriori riguardo alle infezioni virali degli storioni in Italia. I virus degli storioni non sono regolati dalla legislazione, fattore che ne facilita la diffusione. È necessaria una collaborazione sempre più mirata tra ricercatori e allevatori per completare il quadro epidemiologico e patologico e quindi per identificare in futuro una strategia di controllo efficace degli NCLDV nella storionicoltura. Si segnala inoltre una generale scarsa consapevolezza di molti allevatori (non applicabile in questo contesto) riguardo all'importanza della prevenzione e del contenimento delle infezioni virali nella storionicoltura.

7. Bibliografia

-Antuofermo E., Pais A., Nuvoli S., Hetzel U., Burrai G.P., Rocca S., Caffara M., Giorgi I., Pedron C., Prearo M. (2014). *Mycobacterium chelonae* associated with tumor-like skin and oral masses in farmed Russian sturgeons (*Acipenser gueldenstaedtii*). BMC Veterinary Research. 10: 18.

-Arlati G., Bronzi P. (2001). Acquacoltura responsabile verso le produzioni acquatiche del terzo millennio. Cataudella S., Bronzi P. (eds.). Unimar-uniprom: 532-546.

-Athanasopoulou F., Billinis C., Prapas T. (2004). Important disease conditions of newly cultured species in intensive freshwater farms in Greece: first incidence of nodavirus infection in *Acipenser sp.* *Diseases of aquatic organisms*. 60(3): 247-252.

-Austin B., Austin D. A., Munn C. B. (2007). *Bacterial fish pathogens: disease of farmed and wild fish*. 26: 552). Chichester: Springer.

- Axén C., Vendramin N., Toffan A. (2018). Outbreak of mortality associated with *Acipenser Iridovirus European (AcIV-E)* detection in Siberian Sturgeon (*Acipenser baerii*) farmed in Sweden. *Fishes*. 3(4): 42.
- Bauer O. N., Pugachev O. N., Voronin V. N. (2002). Study of parasites and diseases of sturgeons in Russia: a review. *Journal of Applied Ichthyology*. 18(4-6): 420-429.
- Benk"o M., Él"o P., Ursu K., Ahne W., LaPatra S.E., Thomson D., Harrach B. (2002). First molecular evidence for the existence of distinct fish and snake adenoviruses. *J. Virol*. 76: 10056–10059.
- Bigarré L., Lesne M., Lautraite A., Chesneau V., Leroux A., Jamin M., Boitard P.M., Toffan A., Prearo M., Labrut S. (2017). Molecular identification of iridoviruses infecting various sturgeon species in Europe. *J. Fish Dis*. 40: 105–118.
- Billard R., Lecointre G. (2000). Biology and Conservation of Sturgeon and Paddle Fish. *Rev. Fish. Biol. Fish.* 10 : 355-392.
- Bronzi P., Chebanov M., Michaels J.T., Wei Q., Rosenthal H., Gessner, J. (2019). Sturgeon meat and caviar production: Global update 2017. *J. Appl. Ichthyol*. 35: 257– 266.
- Brunetti R., Gasparri F., Marturano S., Prearo M. (2006). Episodio d'infezione da *Pseudomonas fluorescens* in storione siberiano (*Acipenser baerii*) d'allevamento.
- Burt M. D. B., Sandeman I. M. (1969). Biology of *Bothrimonus* (= *Diplocotyle*)(*Pseudophyllidea*: *Cestoda*) Part I. History, description, synonymy, and systematics. *Journal of the Fisheries Board of Canada*. 26(4): 975-996.
- Bychowsky B. E., Gussev A. V. (1950). Parazītolog. sb. *Zoolog. inst. AN SSSR*. 12: 275-98.
- Campos R. K., Andrade K. R., Ferreira P. C. P., Bonjardim C. A., La Scola B., Kroon E. G., Abrahão, J. S. (2012). Virucidal activity of chemical biocides against mimivirus, a putative pneumonia agent. *Journal of clinical virology*. 55(4): 323-328.
- Chebanov M.S., Galich E.V. (2011). Sturgeon hatchery manual. FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper. 2nd Ed. FAO, Rome: 1-303.

- Choudhury A. (1998). Systematics of the Deropristiidae Cable & Hunninen, 1942 (Trematoda) and biogeographical associations with sturgeons (Osteichthyes: Acipenseridae). *Systematic Parasitology*. 41(1): 21-39.
- Ciulli S., Volpe E., Sirri R., Passalacqua P.L., Cesa Bianchi F., Serratore P., Mandrioli L. (2016). Outbreak of mortality in Russian (*Acipenser gueldenstaedtii*) and Siberian (*Acipenser baerii*) sturgeons associated with sturgeon nucleocytoplasmic large DNA virus. *Vet. Microbiol.* 191: 27–34.
- Clouthier S., Anderson E., Kurath G., Breyta R. (2018). Molecular systematics of sturgeon nucleocytoplasmic large DNA viruses. *Molecular phylogenetics and evolution*. 128: 26-37.
- Costinar L., Herman V., Pascu C., Marcu A., Marcu A., Faur B. (2010). Isolation and characterization of *Vibrio alginoliticus* and *Pasteurella spp.* from siberian sturgeon (*Acipenser baerii*). *Lucrari Sci Med Vet* . 203:125-7.
- Davydov V. G., Kuperman B. I. (1993). The ultrastructure of the tegument and the peculiarities of the biology of *Amphilina foliacea* (Plathelminthes, Amphilinidea). *Folia Parasitol.* 40: 13-22.
- Della Rosa C., Cevolani D. (1992). *Il futuro è dello storione?* *Informatore Zootecnico*. 20: 25-30.
- Deng M. L., Yu Z. H., Geng Y., Wang K. Y., Chen D. F., Huang X. L., ... Lai W. M. (2017). Outbreaks of Streptococcosis associated with *Streptococcus iniae* in Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) in China. *Aquaculture research*. 48(3): 909-919.
- Di J., Zhang S., Huang J., Du H., Zhou Y., Zhou Q., Wei Q. (2018). Isolation and identification of pathogens causing haemorrhagic septicaemia in cultured Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*). *Aquaculture Research*. 49(11): 3624-3633.
- Dornas F. P., Silva L. C., De Almeida G. M., Campos R. K., Boratto P. V., Franco-Luiz A. P., ... Abrahão, J. S. (2014). *Acanthamoeba polyphaga* mimivirus stability in environmental and clinical substrates: implications for virus detection and isolation. *PloS one*, 9(2), e87811.
- Dospoly A., Kalabekov I. M., Breyta R., Shchelkunov I. S. (2017). Isolation and characterization of an atypical Siberian sturgeon herpesvirus strain in Russia: novel North American Acipenserid herpesvirus 2 strain in Europe?. *Journal of fish diseases*. 40(10): 1363-1372.

- Dospoly A., Shchelkunov I. (2010). Partial genome analysis of Siberian sturgeon alloherpesvirus suggests its close relation to AciHV-2. *Acta Veterinaria Hungarica*. 58(2): 269-274.
- Doyle J., Doyle J. (1987). A rapid procedure for DNA purification from small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull.* 19: 11-15.
- Drennan J. D., LaPatra S. E., Siple J. T., Ireland S., Cain K. D. (2006). Transmission of *white sturgeon iridovirus* in Kootenai River white sturgeon *Acipenser transmontanus*. *Diseases of aquatic organisms*. 70(1-2): 37-45.
- Dubinin V. B. (1952). Parasitic fauna of young sturgeons of the lower Volga. *Scientific papers of the University of Leningrad* 45: Biol. Series 28: 238-251.
- Dubinina M. N. (1982). Parasitic worms of the class Amphilinida (Plathelminthes). *Nauka L.*: 1-143
- Francis Floyd R. (2000). Diseases history of cultured sturgeon in Florida, 1990-1999, *Proceedings of the Florida sturgeon culture risk assessment workshop*: 33-37.
- Geller E. R., Babich L. A. (1953). On the biology of *Contraecaecum bidentatum*. *Papers of Helminthology, 75th Anniversary of the Academia K. Y. Skriabin, Moscow. Publishing house of the USSR Acad. Sc*: 133-138.
- Georgiadis M.P.; Hedrick R.P.; Johnson W.O.; Yun S.; Gardner I.A. (2000). Risk factors for outbreaks of disease attributable to *white sturgeon iridovirus* and *white sturgeon herpesvirus-2* at a commercial sturgeon farm. *Am. J. Vet. Res.* 61: 1232–1240.
- Georgiadis M. P., Hedrick R. P., Carpenter T. E., Gardner I. A. (2001). Factors influencing transmission, onset and severity of outbreaks due to *white sturgeon iridovirus* in a commercial hatchery. *Aquaculture*, 194(1-2), 21-35.
- Gholamhosseini A., Taghadosi V., Shiry N., Akhlaghi M., Sharifiyazdi H., Soltanian S., Ahmadi N. (2018). First isolation and identification of *Aeromonas veronii* and *Chryseobacterium joostei* from reared sturgeons in Fars province, Iran. In *Veterinary research forum* (Vol. 9, No. 2, p. 113). Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran.
- Groff J. M., LaPatra S. E., Munn R. J., Anderson M. L., Osburn B. I. (1996). Epitheliocystis infection in cultured white sturgeon (*Acipenser transmontanus*):

antigenic and ultrastructural similarities of the causative agent to the chlamydiae. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 8(2): 172-180.

-Hanson L., Doszpoly A., Van Beurden S. J., de Oliveira Viadanna P. H., Waltzek T. (2016). Alloherpesviruses of fish. In *Aquaculture virology* (pp. 153-172). Academic Press.

-Harrach B., Benk"o M., Both G.W., Brown M., Davison A.J., Echavarría M., Hess M., Jones M., Kajon A., Lehmkuhl H., et al. Family Adenoviridae in Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses; King A.M.Q., Adams M.J., Carstens E.B., Lefkowitz E.J., Eds., Elsevier: San Diego, CA, USA: 125–141.

-Hedrick R. P., McDowell T. S., Groff J. M., Yun S., Wingfield W. H. (1992). Isolation and some properties of an iridovirus-like agent from white sturgeon *Acipenser transmontanus*. *Diseases of aquatic organisms*. 12(2): 75-81.

-Hedrick R. P., Speas J., Kent M. L., McDowell T. (1985). Adenovirus-like particles associated with a disease of cultured white sturgeon, *Acipenser transmontanus*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 42(7): 1321-1325.

-Hedrick R., La Patra S., McDowell T., MacConnell B. (2001). A workshop on sturgeon diseases. 4th Int Symp Sturgeon 8–13 July 2001, Oshkosh, WI, USA.

-Hochleithner M., Gessner J. (2012) The Sturgeon and Paddlefishes of the World – Biology and Aquaculture. AquaTech publications, Kitzbuhel, A: 248.

-Hofsoe-Oppermann P., Kiełpińska J., Panicz R., Bergmann S. M. (2019). Detection of white sturgeon iridovirus (WSIV) in sturgeons (Actinopterygii: Acipenseriformes: Acipenseridae) from aquaculture facilities located in Poland, Germany, and Italy. *Acta Ichthyologica et Piscatoria*. 49(3).

-Holcik J., Banarescu P., Evans D.E. (1989). The freshwater fishes of Europe, Vol 1/11. Ed. J. Holcik J. Ada-Verlag, Wiesbaden: 18-147.

-Ivanov V. P., 1966: Helminth fauna of young sturgeons in the River Volga and the Volgograd Reservoir. In: Problems of ecology and parasitology of animals. Saratov University Press: 18-28.

-Izumova N. A., 1977: Fish parasite fauna of the USSR reservoirs and its formation paths. Nauka, L. 1–283.

- Jensen N.J., Bloch B. (1980) Adenovirus-like particles associated with epidermal hyperplasia in cod (*Gadus morhua*). *Nord. Vet. Med.* 32: 173–175.
- Kayaş Ş., Er A. K. İ. F., Kangel P., Kurtođlu İ. Z. (2017). Bacterial pathogens and health problems of *Acipenser gueldenstaedtii* and *Acipenser baerii* sturgeons reared in the eastern Black Sea region of Turkey. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 18(1), 18.
- Karataş S., Ercan D., Stenium T.M., Turgay E., Memiş D., Candan A. (2010). First isolation of a *Flavobacterium johnsoniae* like bacteria from Cultured Russian sturgeon in Turkey. *J. Anim. Vet. Adv.* 9: 1943–1946.
- Kelley G. O., Waltzek T. B., McDowell T. S., Yun S. C., LaPatra S. E., Hedrick, R. P. (2005). Genetic relationships among herpes-like viruses isolated from sturgeon. *Journal of Aquatic Animal Health.* 17(4): 297-303.
- Kempter J., Sadowski J., Schutze H., Fisher U., Dauber M., Fichtner D., Panicz R., Bergmann S.M. (2009). Koi herpes-virus: Do acipenserid restitution programs pose a threat to carp farms in the disease-free zones? *Acta Ichtyol. Piscat.* 39: 119–126.
- Kurobe T., Kelley G. O., Waltzek T. B., Hedrick R. P. (2008). Revised phylogenetic relationships among herpesviruses isolated from sturgeons. *Journal of Aquatic Animal Health.* 20(2): 96-102.
- LaPatra S. E., Groff J. M., Keith I., Hogans W. E., Groman D. (2014). Case report: concurrent herpesviral and presumptive iridoviral infection associated with disease in cultured shortnose sturgeon, *Acipenser brevirostrum* (L.), from the Atlantic coast of Canada. *Journal of fish diseases.* 37(2): 141-147.
- LaPatra S. E., Jones G. R., Lauda K. A., McDowell T. S., Schneider R., Hedrick R. P. (1995). White sturgeon as a potential vector of infectious hematopoietic necrosis virus. *Journal of Aquatic Animal Health.* 7(3): 225-230.
- LaPatra S.E., Parker B.L., Groff J.M., Engelking H.M., Kaufman J., Munn R.J. (1998). Epidemiology of viral infection in white sturgeon from the Pacific Northwest. In *Proceedings of the 49th Annual Pacific Northwest Fish Culture Conference*, Boise, Idaho, 1–3: 27–31.
- Levashov M. M. (1925). On the biology of the parasitic worms of sterlet. I. *Contracaecum bidentatum* Lin. *Rab. Volzhsk. biol. st.* 8: 1-3.

- Lubarskaya O. D., Lavrent'eva Y. I. (1985). Formation features of parasite fauna formation of starlet from Kuybyshevsk reservoir. Proc. Vsesouznogo sovestchaniya po parazitam i boleznyam ryb. Nauka. L. 8: 88-89.
- Lutta A. S. (1941). Inflammation of *Acipenser nudiventris* gills caused by *Mongenea Nitzschia sturionis* Abild. Zool. J. 20: 189-196
- Ma Z., Yang H., Li T., Luo L., Gao J (2009). Isolation and identification of pathogenic *Aeromonas veronii* isolated from infected siberian sturgeon (*Acipenser baerii*). Acta Microbiol. Sin. 49(10):1289-1294.
- Memiş D., Ercan E., Çelikkale M.S., Timur M., Zarku, Z. (2009). Growth and survival rate of Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii*) larvae from fertilized eggs to artificial feeding. *Turkish J. Fish. Aquatic Sci.* 9: 47–52.
- Meng Y., Xiao H. B., Zeng L. B. (2011). Isolation and identification of the hemorrhagic septicemia pathogen from Amur sturgeon, *Acipenser schrenckii*. *Journal of Applied Ichthyology*, 27(2), 799-803.
- Moravec F. (1994). *Parasitic nematodes of freshwater fishes of Europe* (Vol. 385, p. 473). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Mugetti D., Pastorino P., Menconi V., Messina M., Masoero L., Ceresa L., ... Prearo M. (2020). Two new sturgeon species are susceptible to *Acipenser Iridovirus* European (AcIV-E) infection. *Pathogens*. 9(3): 156.
- Mugetti D., Pastorino P., Menconi V., Pedron C., Prearo M. (2020). The old and the new on viral diseases in sturgeon. *Pathogens*. 9(2): 146.
- Muhammad M., Zhang T., Gong S., Bai J., Ju J., Zhao B., Liu D. (2020). *Streptococcus iniae*: A growing threat and causative agent of disease outbreak in farmed Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*). *Pakistan Journal of Zoology*. 52(5): 1931.
- OIE. Infection with infectious haematopoietic necrosis virus. In *Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals Diseases*, 8th ed.; World Organization for Animal Health, Ed.; OIE: Paris, France, 2019.
- Ono S., Wakabayashi K., Nagai A. (2007). Isolation of the virus causing viral endothelial cell necrosis of eel from cultured Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Fish Pathol.* 42: 191–200.

- Owsjannikow P.H. (1871). Ueber einen neuen Parasiten in den Eiern des Sterlets. *Melanges Biologiques* Titles du Bulletin de l'Academie des Sciences de Saint-Petersbourg. 8: 334-338.
- Pallandre L., Lesne M., de Boissésou C., Charrier A., Daniel P., Tragnan A., ... Bigarré L. (2019). Genetic identification of two *Acipenser* iridovirus-European variants using high-resolution melting analysis. *Journal of virological methods*. 265: 105-112.
- Pedron C. (2016). Allevamento e principali patologie degli storioni. *Ittiopatologia*. 13: 97–125.
- Pelkola K., Vennerström P., Viljamaa-Dirks S., et al. (2012). Bacterial infections of farmed sturgeon in Finland. *Fin Food Saf Auth Evira*. 12 :122–127.
- Pierezan F., Shahin K., Heckman T. I., Ang J., Byrne B. A., Soto E. (2020). Outbreaks of severe myositis in cultured white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) associated with *Streptococcus iniae*. *Journal of fish diseases*. 43(4): 485-490.
- Pospichal A., Piackova V., Pokorova D., Vesely T. (2016). Susceptibility of stone loach (*Barbatula barbatula*) and hybrids between sterlet (*Acipenser ruthenus*) and beluga (*Huso huso*) to cyprinid herpesvirus 3. *Vet. Med.* 61: 249–255.
- Pronin N. M. (1977). Parasites of the Selenga stock of the Baikal sturgeons. *Trudy Buryatskogo Inst. Estestvennych nauk BF SO AN SSSR*. 13: 58-61
- Quaglio F., Bocus R., Delgado M.L., Gamberini R., Nobile L., Minelli C., Galuppi A., Restani R. (2020). Infezione da *Aeromonas hydrophila* in sterleti (*Acipenser ruthenus*) in un allevamento della Pianura Padana. *Bollettino della società italiana della patologia ittica*. 28:17-32.
- Radosavljevic V., Milicevic V., Maksimovi'c-Zori'c J., Veljovi'c L., Nesic K., Pavlovi'c M., Ljubojevi'c-Peli'c D., Markovi'c Z. (2019). Sturgeon diseases in aquaculture. *Arch. Vet. Med.*, 12.
- Raikova E. V. (1994). Life cycle, cytology and morphology of *Polypodium hydriforme*, a coelenterate parasite of the eggs of Acipenseriform fishes. *J. Parasitol.* 80: 1-22.

- Raverty S., Hedrick R., Henry J., Saksida S. (2003). British Columbia: Diagnosis of sturgeon iridovirus infection in farmed white sturgeon in British Columbia. *The Canadian Veterinary Journal*. 44(4): 327.
- Raverty S., Nikl L. (1999). Sturgeon mortalities along the Harrison river, British Columbia. Animal health center, Newsletter, Diagnosis and Diary. 9: 10-11.
- Righetti M., Favaro L., Antuofermo E., Caffara M., Nuvoli S., Scanzio T., Prearo M. (2014).
Mycobacterium salmoniphilum infection in a farmed Russian sturgeon, *Acipenser gueldenstaedtii*
(Brandt & Ratzburg). *J. Fish Dis.* 37: 671-674.
- Rusev V., Rusenova N., Simeonov R., Stratev D. (2016). *Staphylococcus warneri* and *Shewanella putrefaciens* Co-infection in Siberian Sturgeon (*Acipenser baerii*) and Hybrid Sturgeon (*Huso huso* x *Acipenser baerii*). *J Microbiol Exp.* 3(1): 00078.
- Salati F., Tass P., Bronzi P. (1996). Isolation of an enterococcus-like bacterium from diseased adriatic sturgeon *Acipenser naccarii*, farmed in Italy. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol*, 16(3), 96.
- Santi M., Pastorino P., Foglini C., Righetti M., Pedron C., Prearo M. (2019). A survey of bacterial infections in sturgeon farming in Italy. *J. Appl. Ichthyol.* 35: 275–282.
- Scanzio T., Pedron C., Foglini C., Marturano S., & Prearo M. (2015).
Acipenseidae: Terza parte. Lo storione russo *Acipenser gueldenstaedtii*.
Brandt & Ratzburg, 1833. *Ittiopatologia*. 12: 5–15.
- Shchelkunov I. S., Shchelkunova T. I., Shchelkunov A. I., Kolbassova Y. P., Didenko L. V., Bykovsky A. P. (2009). First detection of a viral agent causing disease in farmed sturgeon in Russia. *Diseases of aquatic organisms*. 86(3): 193-203.
- Skrjabina E. S. (1974). Helminths of sturgeons. Publishing house 'Nauka' M: 1-168.
- Smith S. A., Hughes K. P., Luoma J. (2002). Amoebic gill infestation in pallid sturgeon, *Scaphirhynchus albus*. *BULLETIN-EUROPEAN ASSOCIATION OF FISH PATHOLOGISTS*. 22(6): 400-402.

- Soltani M., Kalbassi M. R. (2001). Protection of Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) fingerling against *Aeromonas hydrophila* septicemia using three different antigens. *BULLETIN-EUROPEAN ASSOCIATION OF FISH PATHOLOGISTS*. 21(6): 235-240.
- Soto E., Richey C., Stevens B., Yun S., Kenelty K., Reichley S., ... Camus A. (2017). Co-infection of Acipenserid herpesvirus 2 (AciHV-2) and *Streptococcus iniae* in cultured white sturgeon *Acipenser transmontanus*. *Diseases of Aquatic Organisms*. 124(1): 11-20.
- Stachnik M., Matras M., Borzy E., Maj-Paluch J., Reichert M. (2021). Emerging viral pathogens in sturgeon aquaculture in Poland: Focus on Herpesviruses and Mimivirus detection. *Viruses*. 13(8): 1496.
- Strand D.A., Johnsen S.I., Rusch J.C., et al. (2019). Monitoring a Norwegian freshwater crayfish tragedy: eDNA snapshots of invasion, infection and extinction. *J Appl Ecol*. 56: 1661-1673.
- Strand D.A., Jussila J., Johnsen S.I., Viljamaa-Dirks S., Edsman L., Wiik-Nielsen J., Viljugrein H., Engdahl F., Vrålstad, T. (2014). Detection of crayfish plague spores in large freshwater systems. *J Appl Ecol*. 51: 544-553.
- Timur G., Akayli T., Korun J., Yardimci R. E. (2010). A study on bacterial haemorrhagic septicemia in farmed young Russian sturgeon in Turkey (*Acipenser gueldenstaedtii*). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 25(3): 19-27.
- Ture M., Ozcelep T., Akbulut B., Kutlu I. (2018). Disease of Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii*) caused by *Aeromonas* sp. *Genetics of Aquatic Organisms*. 2(2): 43-47.
- Vicenova M., Reschova S., Pokorova D., Hulova J., Vesely T. (2011). First detection of pike fry-like rhabdovirus in barbel and spring viraemia of carp virus in sturgeon and pike in aquaculture in the Czech Republic. *Diseases of aquatic organisms*. 95(2): 87-95.
- Vuillaume A., Brun R. (1987). First isolation of *Yersinia ruckeri* from sturgeon, *Acipenser baerii* Brandt, in southwest of France.
- Wang X., Xu L., Wang J., Wang S., Cao H. (2014). Isolation, identification and drug sensitivity of *Streptococcus iniae* from hybrid sturgeons (*Huso dauricus* female x *Acipenser schrencki* male). *Wei Sheng wu xue bao = Acta Microbiologica Sinica*. 54(4): 442-448.

- Watson L. R., Yun S. C., Groff J. M., Hedrick R. P. (1995). Characteristics and pathogenicity of a novel herpesvirus isolated from adult and subadult white sturgeon *Acipenser transmontanus*. *Diseases of Aquatic Organisms*. 22(3): 199-210.
- Yang W., Li A. (2009). Isolation and characterization of *Streptococcus dysgalactiae* from diseased *Acipenser schrenckii*. *Aquaculture*. 294(1-2): 14-17.
- Zaharia T, Dumitrescu E. (2011). Disease detected at sturgeon reared in fresh and salt water. *Indian Journal of Geomarine Sciences* (National Institute for Marine Research and Development), 82(2):671–685.
- Zhang D. F., Ji C., Zhang X. J., Li T. T., Li A. H., Gong X. N. (2015). Mixed mycobacterial infections in farmed sturgeons. *Aquaculture research*. 46(8): 1914-1923.
- <https://www.acquacoltura.org/produzione-acquacoltura-italiana-2019/>