



Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

# Biologia molecolare applicata alla produzione dei vaccini stabulogeni

Dr. Gianluca Fichi

Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana M. Aleandri  
UOT Toscana sud  
Sezione di Siena

La produzione di vaccini stabulogeni  
26 novembre 2024  
Viale Toselli 12, 53100, Siena









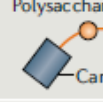
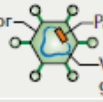

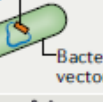
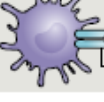
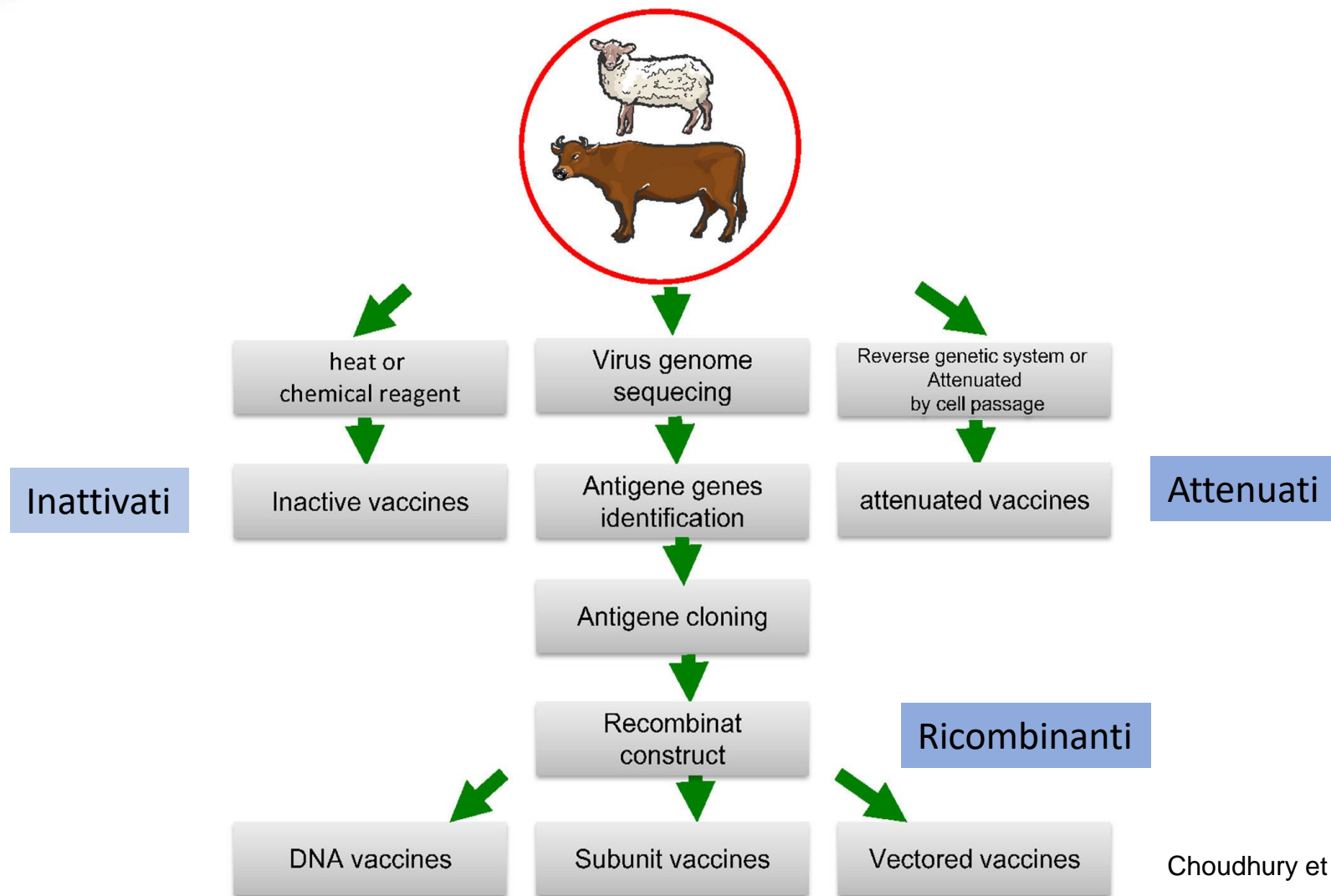
Type of vaccine		Licensed vaccines using this technology	First introduced
Live attenuated (weakened or inactivated)		Measles, mumps, rubella, yellow fever, influenza, oral polio, typhoid, Japanese encephalitis, rotavirus, BCG, varicella zoster	1798 (smallpox)
Killed whole organism		Whole-cell pertussis, polio, influenza, Japanese encephalitis, hepatitis A, rabies	1896 (typhoid)
Toxoid		Diphtheria, tetanus	1923 (diphtheria)
Subunit (purified protein, recombinant protein, polysaccharide, peptide)		Pertussis, influenza, hepatitis B, meningococcal, pneumococcal, typhoid, hepatitis A	1970 (anthrax)
Virus-like particle		Human papillomavirus	1986 (hepatitis B)
Outer membrane vesicle		Group B meningococcal	1987 (group B meningococcal)
Protein-polysaccharide conjugate		<i>Haemophilus influenzae</i> type B, pneumococcal, meningococcal, typhoid	1987 ( <i>H. influenzae</i> type b)
Viral vectored		Ebola	2019 (Ebola)
Nucleic acid vaccine		SARS-CoV-2	2020 (SARS-CoV-2)
Bacterial vectored		Experimental	—
Antigen-presenting cell		Experimental	—

Fig. 2 | Different types of vaccine. Schematic representation of different types of vaccine against pathogens; the text indicates against which pathogens certain vaccines are licensed and when each type of vaccine was first introduced. BCG, *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette–Guérin. Pollard and Bijker, 2021

## Tipi di vaccini:

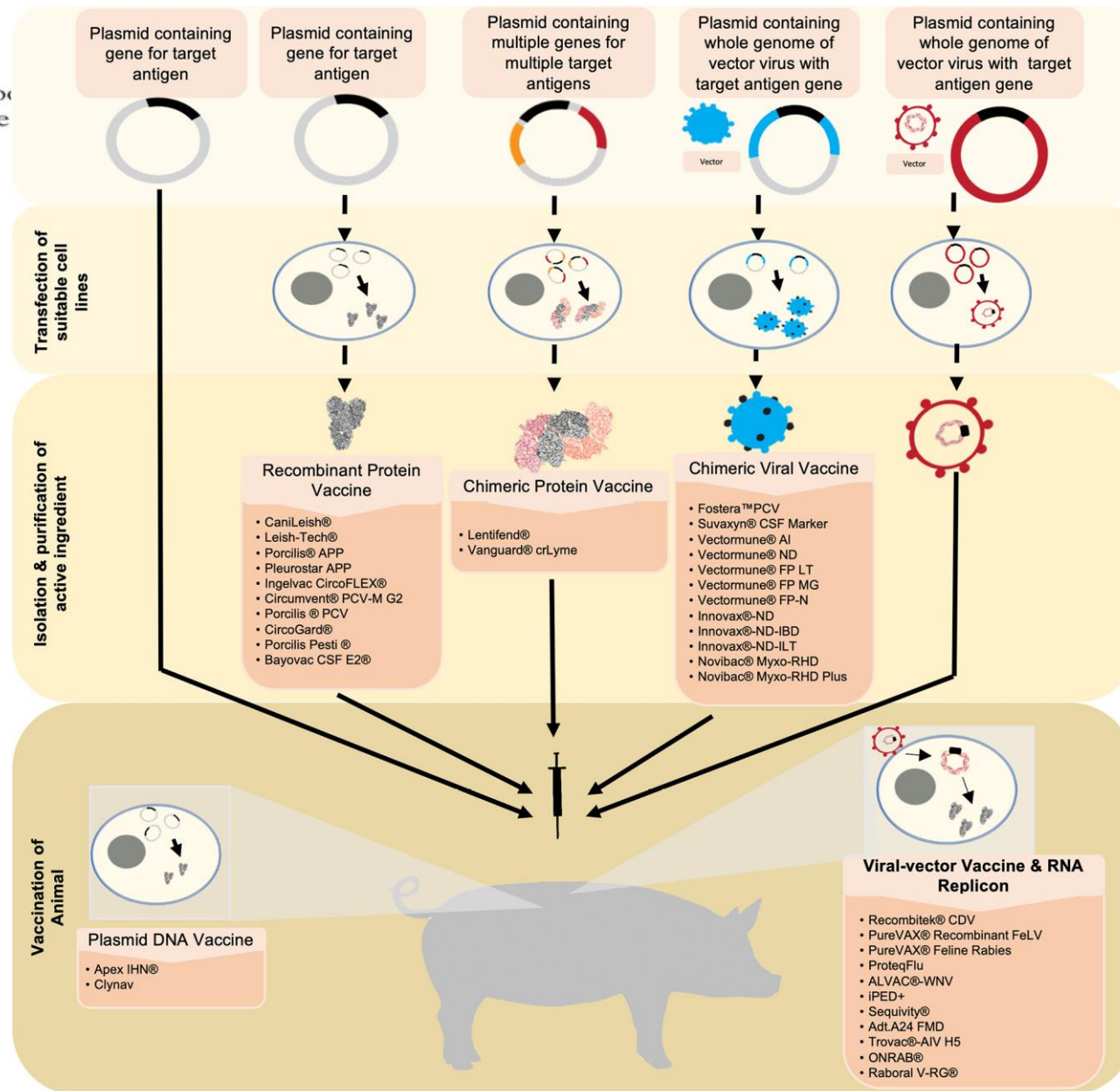
- Vaccini vivi attenuati
- Vaccini spenti o inattivati
- Tossoidi
- Subunità: proteine purificate, proteine ricombinanti, polisaccaridi peptidi
- Virus-like particle: particelle che si autoassemblano come risultato dell'espressione di proteine che codificano capsidi, core o involucri di virus
- Vescicole della membrana esterna: vescicole della membrana esterna piene di contenuto periplasmatico e sono comunemente prodotte da batteri Gram-negativi
- Proteine coniugate con polisaccaridi
- Vettori virali
- Vaccini ad acidi nucleici
- Vettori batterici
- Cellule che presentano l'antigene





Choudhury et al., 2021









Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

Il Laboratorio Produzione Vaccini (Officina Farmaceutica): produce vaccini **inattivati** dall'organismo intero

Come può contribuire la biologia molecolare alla produzione  
dei vaccini stabulogeni?

- **Identificazione del microrganismo**

- **Studio dei geni di virulenza**





Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

## Vaccino stabulogeno per la mastite stafilococcica

Abbiamo messo a punto la real time PCR per *S. aureus*

Wood *et al. BMC Microbiology* (2021) 21:174  
<https://doi.org/10.1186/s12866-021-02247-6>

BMC Microbiology

RESEARCH

Open Access

### SaQuant: a real-time PCR assay for quantitative assessment of *Staphylococcus aureus*



Colin Wood<sup>1</sup>, Jason Sahl<sup>1</sup>, Sara Maltinsky<sup>1</sup>, Briana Coyne<sup>1</sup>, Benjamin Russakoff<sup>1</sup>, David Panisello Yagüe<sup>1</sup>, Jolene Bowers<sup>2</sup> and Talima Pearson<sup>1\*</sup>





## Vaccino stabulogeno per la pasteurellosi da *Pasteurella multocida*

JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Mar. 1981, p. 433-437  
0095-1137/81/030433-05\$02.00/0

Vol. 13, No. 3

### Identification of *Pasteurella multocida* and *Pasteurella haemolytica* by API 20E, Minitek, and Oxi/Ferm Systems

M. T. COLLINS,\* N. WEAVER, AND R. P. ELLIS

TABLE 3. Identification of *P. multocida* by rapid identification systems

Identification	% of cultures identified by:		
	API	Minitek	Oxi/Ferm
Correct	64	64	76 <sup>a</sup>
Incorrect	10	18	22
None	26	18	2

<sup>a</sup> Correct categorization, no specific identification (see Table 5).





Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

## Vaccino stabulogeno per la pasteurellosi da *Mannheimia haemolytica*

JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Mar. 1981, p. 433-437  
0095-1137/81/030433-05\$02.00/0

Vol. 13, No. 3

### Identification of *Pasteurella multocida* and *Pasteurella haemolytica* by API 20E, Minitek, and Oxi/Ferm Systems

M. T. COLLINS,\* N. WEAVER, AND R. P. ELLIS



Advances in Microbiology, 2017, 7, 304-314  
<http://www.scirp.org/journal/aim>  
ISSN Online: 2165-3410  
ISSN Print: 2165-3402

### Molecular and Phenotypical Characterization of *Mannheimia haemolytica* Isolated from Goats in Baghdad Province

Waffa A. Ahmed<sup>1</sup>, Roua J. Mohammed<sup>1</sup>, Ilham A. Khalaf<sup>2</sup>

TABLE 4. Identification of *P. haemolytica* by rapid identification systems

Identification	% of cultures identified by:		
	API	Minitek	Oxi/Ferm
Correct	20	26 <sup>a</sup>	96 <sup>b</sup>
Incorrect	38	68	2
None	42	6	2

<sup>a</sup> Identified as *Pasteurella* species only.

<sup>b</sup> Correct categorization, not specifically identified (see Table 6).

API20E per l'identificazione degli isolati di campo  
ha mostrato una bassa discriminazione per *M. haemolytica* (18%)

Stiamo mettendo a punto real time

SCIENTIFIC  
REPORTS

nature research

Corrected: Author Correction

### Insights into *Pasteurellaceae* carriage dynamics in the nasal passages of healthy beef calves

A. C. Thomas<sup>1,2,4</sup>, M. Bailey<sup>1</sup>, M. R. F. Lee<sup>1,2</sup>, A. Mead<sup>3</sup>, B. Morales-Aza<sup>4,5</sup>, R. Reynolds<sup>1,6</sup>, B. Vipond<sup>7</sup>, A. Finn<sup>4,5,6</sup> & M. C. Eisler<sup>1</sup>





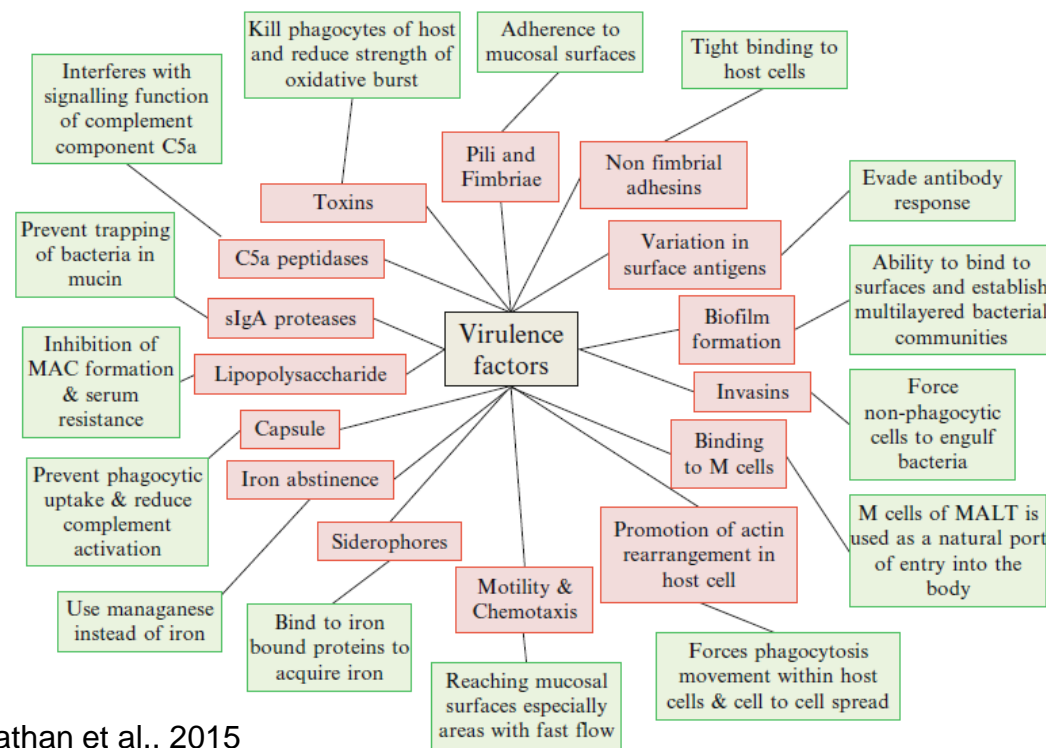
### • **Identificazione del microrganismo**

- Vaccino stabulogeno per la mastite stafilococcica
- Vaccino stabulogeno per la pasteurellosi da *Pasteurella multocida*
- Vaccino stabulogeno per la pasteurellosi da *Mannheimia haemolytica*
- Vaccino stabulogeno per *Escherichia coli*
- Vaccino stabulogeno per la broncopolmonite purulenta degli equini da *Rhodococcus equi*
- Vaccino stabulogeno per l'aborto salmonellare degli ovini da *Salmonella enterica* subsp *enterica* serovar *Abortus ovis*
- Vaccino stabulogeno per l'aborto salmonellare degli equini da *Salmonella enterica* subsp *enterica* serovar *Abortus equi*
- Vaccino stabulogeno per la piodermite del cane da *Staphilococchi* coagulasi positivi
- Vaccino stabulogeno per le Vibriosi da *Vibrio harveyi* e *Vibrio alginolyticus* delle specie ittiche marine (spigola e orata)
- Vaccino stabulogeno per la lactococcosi da *Lactococcus garvieae* delle specie ittiche marine (spigola e orata)
- Vaccino stabulogeno per l'aeromoniasi da *Aeromonas veronii* della spigola (*Dicentrarchus labrax*)
- Vaccino stabulogeno per la fotobatteriosi da *Photobacterium damsela* subsp *piscicida* delle specie ittiche marine, (spigola e orata)



I fattori di virulenza microbica comprendono un'ampia gamma di molecole prodotte da agenti patogeni che migliorano la loro capacità di eludere le difese dell'ospite e causare malattie.

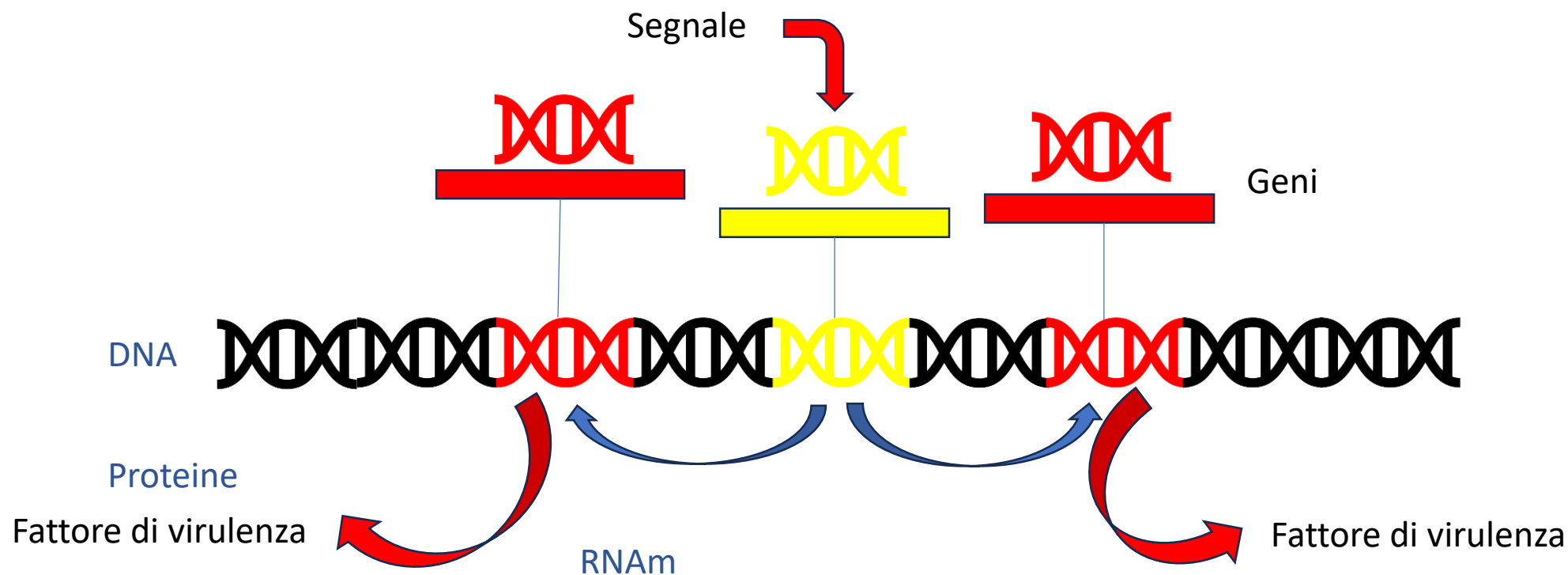
Questa ampia definizione comprende **prodotti secreti come tossine, enzimi, esopolisaccaridi e strutture superficiali delle cellule come capsule, lipopolisaccaridi, glico- e lipoproteine.**



Viswanathan et al., 2015

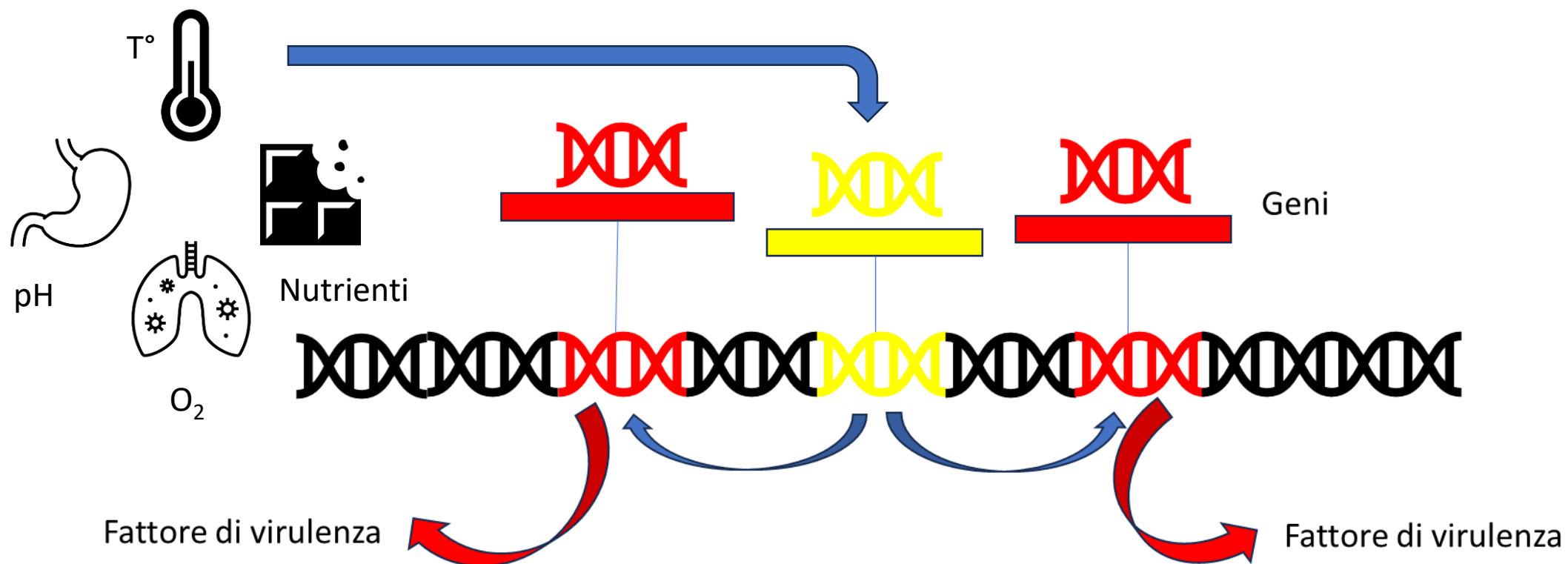


La gravità dell'infezione e la progressione della malattia sono influenzate dalla presenza o assenza di particolari fattori di virulenza. Ad esempio, mentre alcuni ceppi di *Escherichia coli* sono privi di questi fattori di virulenza e producono solo una gastroenterite lieve, altri ceppi trasportano fattori di virulenza che consentono loro di indurre diarrea grave e danni renali (Abdulateef et al., 2023)



L'espressione di tali geni è spesso regolata da fattori trascrizionali che rispondono a **segnali ambientali**

I fattori di virulenza batterica possono anche essere influenzati da parametri ambientali quali temperatura, pH, disponibilità di nutrienti e livelli di ossigeno. (Abdulateef et al., 2023)



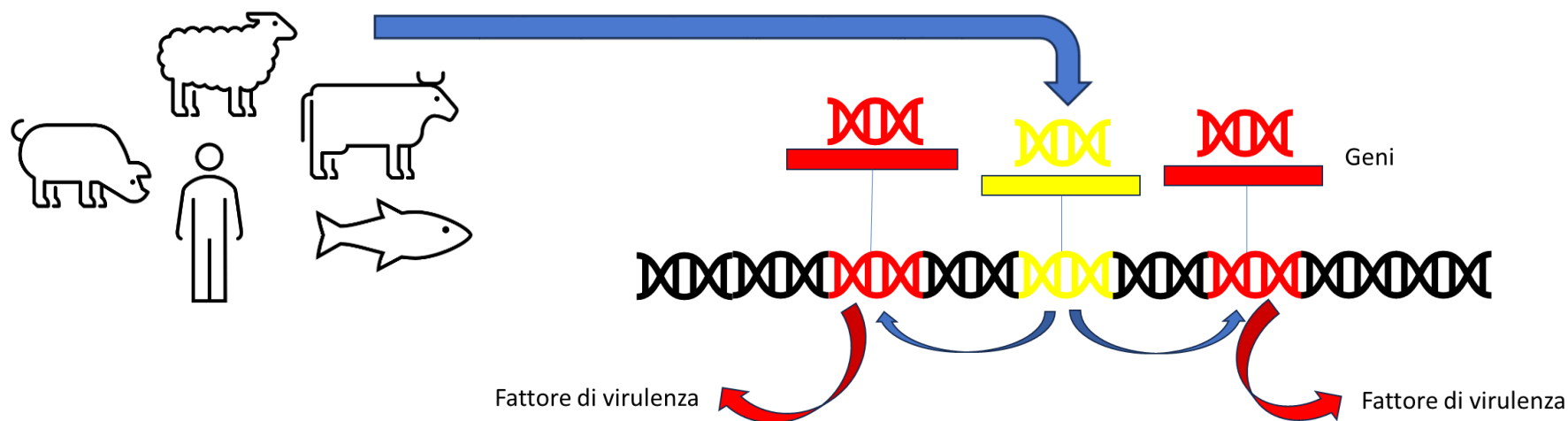


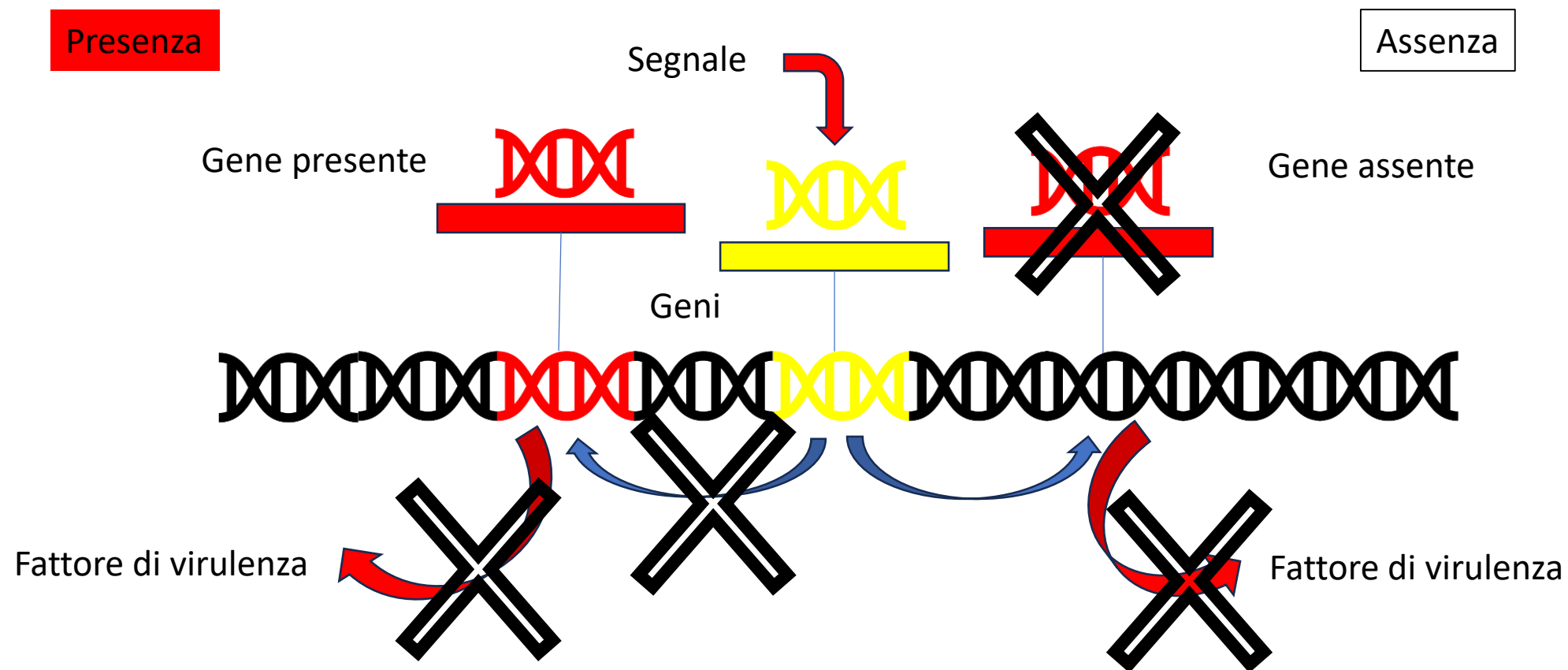
Altri regolatori trascrizionali regolano l'espressione del fattore di virulenza in risposta ai **segnali dell'ospite**

L'espressione dei fattori di virulenza può essere stimolata dai parametri dell'ospite:

- L'interazione con le cellule epiteliali dello stomaco e il pH dello stomaco in *H. pylori*
- Il fibrinogeno in *S. aureus*
- Carenza di ferro in *Yersinia pseudotuberculosis*

(Abdulateef et al., 2023; Cheung et al., 2004)





Ai fini del **DECRETO 17 marzo 1994, n. 287**, si intendono per:

a) **vaccini stabulogeni**, *medicinali veterinari ad azione immunizzante preparati per microrganismi patogeni e/o antigeni isolati da soggetti colpiti dalla forma infettiva dominante in quel **determinato allevamento** ed impiegati per trattare **tale allevamento** ed allevamenti dello stesso territorio, qualora il veterinario lo ritenga opportuno per **documentati motivi epidemiologici**;*

Ai fini del **REGOLAMENTO (UE) 2019/6 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO**

dell'11 dicembre 2018 relativo ai medicinali veterinari e che abroga la direttiva 2001/82/CE:

Oltre ai prodotti di cui al paragrafo 1 del presente articolo, gli articoli 94, 105, 108, 117, 120, 123 e 134 si applicano anche ai medicinali veterinari immunologici inattivati, fabbricati da patogeni e antigeni ottenuti da un animale o da animali in **un'unità epidemiologica** e impiegati per il trattamento di tale animale o tali animali nella stessa **unità epidemiologica** o per il trattamento di un animale o di animali in un'unità per la quale è stata **confermata una correlazione epidemiologica**.





Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

IZSLER IZS\_loer RGP Prot. n. 0019825 del 22/06/2018 8.2.1.0.0.0/1/2018 - AGD 949



Ministero della Salute

DIREZIONE GENERALE DELLA SANITÀ ANIMALE E  
DEI FARMACI VETERINARI  
Ufficio 4 - Medicinali veterinari  
Viale Giorgio Robbati, 3 - 00144 Roma

Ministero della Salute  
DGSRF

0015346-P-22/06/2018



A: ISTITUTI ZOOPROFILATTICI  
SPERIMENTALI  
SEDE

Oggetto: Utilizzo medicinali veterinari immunologici inattivati, aventi caratteristiche di vaccini stabulogeni ed autovaccini ai sensi del Decreto Ministeriale 283 del 17/3/1994

Anche in relazione a segnalazioni pervenute alla scrivente Direzione Generale, si richiama l'attenzione sul ricorso a vaccini stabulogeni tenendo conto di tutti i limiti di impiego dei vaccini in parola indicati nella nota ministeriale n. 15165-P-08/06/2015, che ad ogni buon fine si ritrasmette.

In particolare si sottolinea che l'utilizzo dei vaccini stabulogeni e degli autovaccini deve essere necessariamente circoscritto al singolo animale o all'allevamento e allevamenti dello stesso territorio dove è avvenuto l'isolamento ed è consentito solo in mancanza di vaccini specifici regolarmente autorizzati (con AIC) o in caso di loro documentata impossibilità di impiego in campo per motivi di farmacovigilanza o in presenza di focolai o forme morbose causate da varianti scientificamente riconosciute per avere scarsa affinità antigenica con i ceppi presenti nei vaccini in commercio.

Pertanto la produzione di tutti i vaccini stabulogeni e autovaccini deve essere necessariamente vincolata, in aggiunta alle relative autorizzazioni ministeriali, anche alla giustificazione documentata del veterinario richiedente.

Si richiede pertanto di attenersi alle disposizioni sopra richiamate.

IL DIRETTORE GENERALE  
Dott. Silvio Borello

## Utilità per i vaccini stabulogeni:

In particolare si sottolinea che l'utilizzo dei vaccini stabulogeni e degli autovaccini deve essere necessariamente circoscritto al singolo animale o all'allevamento e allevamenti dello stesso territorio dove è avvenuto l'isolamento ed è consentito solo in mancanza di vaccini specifici regolarmente autorizzati (con AIC) o in caso di loro documentata impossibilità di impiego in campo per motivi di farmacovigilanza o in presenza di focolai o forme morbose causate da varianti scientificamente riconosciute per avere scarsa affinità antigenica con i ceppi presenti nei vaccini in commercio.

## Proposal of the Italian Experimental Zooprohylactic Institutes (Istituti Zooprofilattici Sperimentali) EU-GMP for veterinary autogenous vaccines 26th January 2023

La produzione è consentita anche in caso di epidemie o forme morbose causate da **varianti scientificamente** riconosciute come aventi **poca affinità antigenica** con i ceppi presenti nei vaccini di commercio.







Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

**Alcuni esempi:**

**Ricerca Corrente 03/2024: Clostridi**

**Fattori di virulenza dell'*Aeromonas veronii***

**Progetto europeo *Lactococcus garvieae***

**Studio di alcuni fattori di virulenza dello *Staphylococcus aureus* nei vaccini stabulogeni**





Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

## Ricerca Corrente LT 03/2024: Studio dei fattori di virulenza dei clostridi e loro identificazione molecolare per la successiva messa a punto di vaccini stabulogeni

### Ascolto del territorio

Le clostridiosi provocano ingenti perdite negli allevamenti

I fallimenti vaccinali e la periodica difficile reperibilità dei vaccini contro le clostridiosi hanno fatto aumentare negli ultimi tempi la richiesta di vaccino stabulogeno verso questi patogeni presso l'Officina Farmaceutica di Siena che, al momento, non produce questo vaccino

La richiesta del vaccino stabulogeno per la clostridiosi è la più frequente tra i vaccini non prodotti dall'O.F. di Siena



spostamento dell'utenza verso altri IZS confinanti



**Table 1: Disease groups caused by *Clostridium* species**

Disease group	Manifestation of disease	Causative organism
Enterotoxaemia/ other alimentary tract infection	Enterotoxaemia	<i>Clostridium perfringens</i>
	Abomasitis	<i>Clostridium sordellii</i>
	Tyzzar's disease	<i>Clostridium piliforme</i>
	Quail enteritis	<i>Clostridium colinum</i>
	Enterotyphlitis (rabbits)	<i>Clostridium spiroforme</i>
	Enteritis	<i>Clostridium difficile</i>
Histotoxic	Myositis/'blackleg'	<i>Clostridium chauvoei</i>
	Malignant oedema/gas gangrene (‘false blackleg’)	<i>Clostridium septicum</i>
	Hepatitis: black disease	<i>Clostridium novyi</i>
	Hepatitis	<i>Clostridium haemolyticum</i>
	Malignant oedema, genital tract infection	<i>Clostridium sordellii</i>

Otter and Uzal., 2020





Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

## Difficoltà diagnostiche provocano sotto/sovra stima delle clostridiosi in allevamento

La diagnosi di clostridiosi negli animali spesso si basa sui rilievi anatomopatologici, sull'isolamento e identificazione mediante test biochimici del clostridio. La proliferazione di questi batteri, presenti spesso anche in animali sani, e la diffusione nell'organismo nel *post mortem* con il loro coinvolgimento nei fenomeni putrefattivi rende la diagnosi di clostridiosi difficile.

In alcuni casi, l'identificazione e il conteggio delle colonie dal contenuto intestinale o l'esame istopatologico possono essere di ausilio, così come la dimostrazione di alcune tossine, es. per *C. perfringens* mediante test ELISA. Alcuni Clostridi come il *C. difficile*, coinvolto nella dissenteria dei suinetti, sono invece difficili da coltivare.







Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana M. Alea

Per lo sviluppo di vaccini stabulogeni è necessario indagare la virulenza dei ceppi isolati.

*C. perfringens* è classificato in 7 tossinotipi (A - G) a seconda della produzione delle tossine principali ma può produrre fino a 15 tossine diverse

Table 4: Gross pathology and diagnostic criteria for diseases of *Clostridium perfringens* in farm animals

Disease (organism)	Age range affected	Gross pathology	Minimum samples required at postmortem examination	Diagnostic confirmation
<b>Cattle</b>				
Enterotoxaemia ( <i>C. perfringens</i> type D)	All ages	Variable, lung oedema (caudal lobes most severely affected)	Intestine content*, fixed brain**	Demonstration of E toxin and brain histopathology
<b>Sheep</b>				
Yellow lamb disease ( <i>C. perfringens</i> type A)	Weaned lambs	Anaemia, jaundice, haemoglobinuria, lung oedema	Intestine content*, fixed lung and liver	Identification of $\alpha$ toxin, histopathology of liver (periacinar necrosis) and lung (oedema), <i>C. perfringens</i> colony counting***
Lamb dysentery ( <i>C. perfringens</i> type B)	Lambs aged up to three weeks old	Haemorrhagic enteritis, mucosal necrosis, + fibrinous pericardial effusion, + brain swelling/ cerebellar coning	Intestine content*	Identification of $\alpha$ , $\beta$ **** and E toxins
Haemorrhagic enteritis ( <i>C. perfringens</i> type C)	Lambs aged up to three weeks old	Haemorrhagic enteritis	Intestine content*	Identification of $\alpha$ and $\beta$ **** toxins
Pulpy kidney disease ( <i>C. perfringens</i> type D)	All ages	Fibrinous pericardial effusion, swelling of gyri of cerebral hemispheres and/ or cerebellar coning, focal symmetrical encephalomalacia	Intestine content*	Identification of $\alpha$ and E toxins
<b>Pigs</b>				
Enterotoxaemia ( <i>C. perfringens</i> type A)	Piglets aged up to seven days old	Enteritis, which is usually not haemorrhagic	Intestine content*, fixed small intestine	Identification of $\alpha$ and $\beta$ **** toxins, histopathology on intestine
Enterotoxaemia ( <i>C. perfringens</i> type C)	Piglets aged up to seven days old	Haemorrhagic enteritis	Intestine content*	Identification of $\alpha$ and $\beta$ **** toxins
<b>Goats</b>				
Enterotoxaemia ( <i>C. perfringens</i> type D)	All ages	Acute or subacute: haemorrhagic or non-haemorrhagic enteritis Chronic: swelling of gyri of cerebral hemispheres	Intestine content*, fixed brain**	Identification of $\alpha$ and E toxin, or brain histopathology*****
<b>Chickens</b>				
Necrotic enteritis ( <i>C. perfringens</i> type G)	Broilers, usually aged between two and six weeks old	Necrotic pseudomembranous enteritis	Small intestine content, fixed intestine	Identification of NetB toxin and intestinal histopathology

Otter and Uzal., 2020





***C. sordellii***: l'azione delle tossine letali di (TcsH e TcsL) è documentata nell'uomo e negli animali da esperimento, ma sebbene la presenza di ceppi atossigeni sia conosciuta nell'uomo, non è studiata negli animali.

***C. difficile***: la patogenicità di *C. difficile* è associata alla produzione di TcdA e TcdB e i ceppi non-tossigenici non sono patogeni

***C. novyi***: è classificato in 4 genotipi (A-D) con diversa patogenicità sulla base della produzione di 2 tossine letali (TcnA e TcnB)





Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

Scopo del progetto sarà:

- Messa a punto di PCR per l'identificazione dei clostridi a partire da colonie batteriche isolate e da organi/tessuti animali.
- Messa a punto di PCR per l'identificazione dei diversi tossinotipi.

I risultati saranno messi in correlazione alle lesioni anatomo-patologiche ed istologiche osservate per studiare i diversi tossinotipi evidenziati

Tutto questo permetterà di dare il via all'iter necessario per ottenere l'autorizzazione alla produzione dei vaccini stabulogeni contro le clostridiosi, e soddisfare così le richieste e le necessità degli allevatori da parte del settore zootecnico





## Impatto della ricerca:

### 1. Territorio:

Possibilità di produzione vaccino stabulogeno da integrare al vaccino commerciale

### 2. Esigenze delle strutture IZSLT:

Diagnosi più accurata di clostridiosi

### 3. Gap scientifico:

identificazione dei tossinotipi coinvolti negli episodi di clostridiosi negli animali e relazione con lesioni anatomo-patologiche ed istologiche





## Aeromonas veronii

Negli ultimi anni, *Aeromonas veronii* è stata riconosciuta come **patogena** per diverse specie di pesci, ma anche per anfibi e invertebrati acquatici oltre ad essere un patogeno opportunista associato a diverse forme di infezione nell'uomo e negli animali.

La **patogenesi** delle infezioni da *Aeromonas* è legata a **diversi fattori** come la produzione di sostanze biologicamente attive, la capacità di adesione agli organi e la produzione di fattori extracellulari come enzimi e tossine.

Le **lesioni** provocate dalle infezioni da *A. veronii* sono infatti **associate alla produzione di fattori di virulenza**, che causano danno cellulare e degenerazione, come l'aerolisina (aer), l'enterotossina citossica (act) e l'enterotossina citotonica (alt).





Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

L'**identificazione** della presenza di fattori di virulenza che mediano l'infiammazione nei pesci è quindi essenziale per comprendere la loro **patogenicità** e per lo **sviluppo di vaccini**.

I **fattori di virulenza** conosciuti per le *Aeromonas* sono **molti**, come le proteine di membrana, fattori di motilità, tossine, proteasi, proteine del quorum sensing systems (meccanismo per la regolazione dell'espressione genica in risposta alla densità della popolazione cellulare) così come del sistema di secrezione e del sistema di acquisizione del ferro.





Geni	Autore	Primer Forward	Primer Reverse
<i>acg</i>	<i>Youssef et al., 2023 (761bp)</i>	AACAAGCACCCGTTAAGCCAC	ACGTAGTCGAGCCCTTGAGG
<i>act</i> ,	<b>Zang et al., 2019 (232 bp)</b>	<b>GAGAAGGTGACCACCAAGAACA</b>	<b>AACTGACATCGGCCTTGAAGCTC</b>
<i>aer</i> ,	<b>Zang et al., 2019 (431bp)</b>	<b>CCTATGGCCTGAGCGAGAAG</b>	<b>CCAGTTCAGTCCCACCACT</b>
<i>Aha</i>	<b>Zang et al., 2019 (1082bp)</b>	<b>GGCTATTGCTATCCCGGCTCTGTT</b>	<b>CGGTCCACTCGTCGTCCATCTTG</b>
<i>ahp</i> ,	<i>Youssef et al., 2023 (911bp)</i>	ATTGGATCCCTGCCTA	GCTAAGCTTGCATCCG
<i>ahyB</i>	<i>Hossain et al., 2016 (513bp)</i>	ACACGGTCAAGGAGATCAAC	CGCTGGTGTGGCCAGCAGG
<i>alt</i>	<i>Youssef et al., 2023 (442bp)</i>	TGA CCC AGT CCT GGC ACG GC	GGT GAT CGA TCA CCA CCA GC
<i>ascV</i>	<i>Hossain et al., 2016 (891bp)</i>	AGCAGATGAGTATCGACGG	AGGCATTCTCCTGTACCAG
<i>ast</i>	<i>Youssef et al., 2023 (331bp)</i>	TCTCCATGCTTCCCTTCCACT	GTGTAGGGATTGAAGAAGCCG
<i>ela</i>	<i>Youssef et al., 2023 (513bp)</i>	ACACGGTCAAGGAGATCAAC	CGCTGGTGTGGCCAGCAGG
<i>eprCAI</i> ,	<i>Youssef et al., 2023 (387bp)</i>	GCTCGACGCCAGCTCACC	GGCTCACCAGATTGGATTCTG
<i>exu</i>	<b>Zang et al., 2019 (323bp)</b>	<b>AGACATGCACAACCTCTTCC</b>	<b>GATTGGTATTGCC(C/T)TGCAA</b>
<i>Fla</i>	<i>Youssef et al., 2023 (608bp)</i>	TCC AAC CGT YTG ACCTC	GMYTG GTT GCG RAT GGT
<i>flgA</i>	<i>Liu et al., 2022</i>	GGGACCTGCTGAGTGAAA	GACCGATACGGCACCTAC
<i>flaH</i>	<i>Liu et al., 2022</i>	ACCCGTCTGTATCGTTTCCC	CGTCCAGCGAGCTGTTGAG
<i>flgM</i>	<i>Liu et al., 2022</i>	GCTACTGTCAAGCTGGACTC	AGATTGGCCTCGAAACTG
<i>flgN</i>	<i>Liu et al., 2022</i>	AGTTGCTTGCTGCGATAGA	AGACGACGGTTTGAGACG
<i>fliD</i>	<i>Cheng et al., 2022</i>	GTCGGATAGCACAACCTCT	TTATGCCCATCTGAAAAAT
<i>fliR</i>	<i>Zang et al., 2021 (300bp)</i>	CAGGCTCAGGTGCGTTATGGC	CTGTTCCGGCGTCTGGTTGTC
<i>gcaT</i>	<i>Sun et al., 2016 (237bp)</i>	CTCCTGGAATCCCAAGTATCAG	GGCAGGTTGAACAGCAGTATCT
<i>gspE</i>	<i>Zang et al., 2021 (206bp)</i>	AGCTTGCCCTCACTCCTGGTCTC	CCGCCGATACGCAACGAGATAC
<i>gyrB</i>	<i>Zang et al., 2019 (1100bp)</i>	TCCGGCGGTCTGCACGGCGT	TTGTCCGGGTTGTACTCGTC
<i>hly</i> ,	<i>Youssef et al., 2023 (597bp)</i>	GGCCGGTGGCCGAAGATACGGG	GGCGGCGCCGACGAGACGGG
<i>LafA</i>	<i>Sun et al., 2016 (550bp)</i>	GGTCTGCGCATCCAATC	GCTCCAGACGGTTGATG
<i>lip</i> ,	<b>Zang et al., 2019 (247bp)</b>	<b>CACCTGGT(T/G)CCGCTCAAG</b>	<b>GTACCGAACCAGTCGGAGAA</b>
<i>lpxA</i>	<i>Zang et al., 2021 (234bp)</i>	CGTGGCACCATTCAAGATCAGAG	GTTGTTGGCGAAGATGCAGTTGTC
<i>lpxD</i>	<i>Zang et al., 2021 (151bp)</i>	GCTCGGCGGTGTGACTATTGG	GGCGATCTGGCACTGGTTGTC
<i>LuxS</i>	<b>Zang et al., 2019 (369bp)</b>	<b>GATCCTCTCCGAGGCGTGG</b>	<b>AGGCTTTTCAGCTTCTCTTCC</b>
<i>ompAI</i> ,	<i>Sun et al., 2016 (1026bp)</i>	GACGATATCATGATGAAAATGGCTCTT	GCGAAGCTTTTACTTCTGAATTCTTG
<i>ompAII</i> ,	<i>Sun et al., 2016 (1001bp)</i>	GCTGAATTCATGAAACTCAAAATGGCTC	GCGAAGCTTTTACTGTTGTAATTGC
<i>phoA</i>	<i>Zang et al., 2021 (176bp)</i>	TGATGCCCAGACCACCGACTC	GCTGCTCATGGCGATCACCTC
<i>phob</i>	<i>Zang et al., 2021 (176bp)</i>	AGGAGGACAAGGTGCGTGGTC	TGGAGGCGAGCGGTCAACTC
<i>secA</i>	<i>Sun et al., 2016 (1001bp)</i>	GCTGAATTCATGAAACTCAAAATGGCTC	GCGAAGCTTTTACTGTTGTAATTGC
<i>ser</i>	<b>Zang et al., 2019 (211bp)</b>	<b>CTCCTACTCCAGCGTCGGC</b>	<b>GATCGTCGGTGCGGTTGT</b>
<i>tapA</i>	<i>Liu et al., 2022</i>	ATGACCTCTAGCCCAATA	ACCCGATTGATTTCTGCC

\*Gene regolatore degli altri



Ma pochi sono quelli su cui è stato effettuato uno studio di patogenicità in vivo.

Tra essi vi sono sette fattori prodotti dai geni di virulenza **aer**, **act**, **Aha**, **ser**, **exu**, **lip**, e **LuxS** per cui è stata valutata la dose letale 50 (LD50) nel topo (Li et al., 2020) e nei pesci (Zhang et al., 2019).

**Table 2** LD<sub>50</sub> of *Aeromonas* strains with the different virulence gene profiles in the Northern snakehead

Genotype	Strain	<i>Aeromonas</i> species	LD <sub>50</sub> (CFU per ml)	Virulent/avirulent <sup>*</sup>
<i>aer/ser/act/Aha/exu/lip/LuxS</i>	W31	<i>A. veronii</i> biovar <i>veronii</i>	$2.5 \times 10^4$	V
	A47	<i>A. hydrophila</i>	$4.5 \times 10^3$	V
	A39	<i>A. sobria</i> biovar <i>sobria</i>	$3.2 \times 10^5$	V
<i>aer/ser/act/Aha/exu/lip</i>	D34	<i>A. veronii</i> biovar <i>veronii</i>	$2.8 \times 10^4$	V
	W49	<i>A. hydrophila</i>	$2.7 \times 10^4$	V
	A134	<i>A. sobria</i> biovar <i>sobria</i>	$3.5 \times 10^6$	AV
<i>aer/ser/act/Aha/exu</i>	A50		$2.3 \times 10^5$	V
	W189	<i>A. hydrophila</i>	$1.9 \times 10^5$	V
	W114	<i>A. sobria</i> biovar <i>sobria</i>	$3.4 \times 10^6$	AV
	W131	<i>A. caviae</i>	$5.3 \times 10^6$	AV
<i>aer/ser/act/Aha</i>	W168		$2.9 \times 10^6$	AV
	A78	<i>A. hydrophila</i>	$3.4 \times 10^6$	AV
	D45	<i>A. sobria</i> biovar <i>sobria</i>	$5.7 \times 10^7$	AV
	D75	<i>A. jandaei</i>	$4.6 \times 10^6$	AV
	A86	<i>A. caviae</i>	$3.6 \times 10^7$	AV
	A81	<i>A. veronii</i> biovar <i>veronii</i>	$3.8 \times 10^7$	AV
<i>aer/ser/act</i>	W204	<i>A. hydrophila</i>	$4.6 \times 10^6$	AV
	W194	<i>A. sobria</i> biovar <i>sobria</i>	$5.1 \times 10^7$	AV
	D59	<i>A. jandaei</i>	$4.3 \times 10^7$	AV
	D189	<i>A. caviae</i>	$3.7 \times 10^8$	AV
	D97	<i>A. veronii</i> biovar <i>veronii</i>	$3.5 \times 10^7$	AV
<i>aer/act</i>	D19	<i>A. hydrophila</i>	$4.2 \times 10^7$	AV
	A159	<i>A. sobria</i> biovar <i>sobria</i>	$6.3 \times 10^7$	AV
	W99	<i>A. jandaei</i>	$5.8 \times 10^7$	AV
	W70	<i>A. caviae</i>	$6.1 \times 10^8$	AV

<sup>\*</sup>The strains (LD<sub>50</sub> < 10<sup>6</sup>) were included in the virulent category (V), and the strains (LD<sub>50</sub> ≥ 10<sup>6</sup>) were identified as avirulent (AV).



Nello studio di Li e colleghi (2020), il numero di geni di virulenza presente nei ceppi corrisponde ad un aumento di patogenicità nel topo e solo i ceppi non presentanti nessun gene sono risultati non letali (Li et al., 2020).



animals



Article

### *Aeromonas veronii* Infection in Commercial Freshwater Fish: A Potential Threat to Public Health

Tong Li <sup>1</sup>, Sayed Haidar Abbas Raza <sup>2</sup>, Bintong Yang <sup>1,3</sup>, Yufeng Sun <sup>1</sup>, Guiqin Wang <sup>1</sup>, Wuwen Sun <sup>1</sup>, Aidong Qian <sup>1</sup>, Chunfeng Wang <sup>1</sup>, Yuanhuan Kang <sup>1,\*</sup> and Xiaofeng Shan <sup>1,\*</sup>

Table 7. Pathogenicity test results for mice in subject to *A. Veronii* infection.

Strains Name	Virulence Genotype	LD50 (CFU·mL <sup>-1</sup> )
CC7282-3	<i>aer</i> <sup>-</sup> <i>ser</i> <sup>-</sup> <i>act</i> <sup>-</sup> <i>Aha</i> <sup>-</sup> <i>exu</i> <sup>-</sup> <i>lip</i> <sup>-</sup>	\
SL7231-1	<i>aer</i> <sup>+</sup> <i>ser</i> <sup>-</sup> <i>act</i> <sup>-</sup> <i>Aha</i> <sup>-</sup> <i>exu</i> <sup>-</sup> <i>lip</i> <sup>-</sup>	4.51 × 10 <sup>9</sup>
CC7281-2	<i>aer</i> <sup>+</sup> <i>ser</i> <sup>+</sup> <i>act</i> <sup>-</sup> <i>Aha</i> <sup>-</sup> <i>exu</i> <sup>-</sup> <i>lip</i> <sup>-</sup>	3.22 × 10 <sup>8</sup>
SL7232-1	<i>aer</i> <sup>+</sup> <i>ser</i> <sup>+</sup> <i>act</i> <sup>+</sup> <i>Aha</i> <sup>-</sup> <i>exu</i> <sup>-</sup> <i>lip</i> <sup>-</sup>	4.27 × 10 <sup>7</sup>
SJ7231-3	<i>aer</i> <sup>+</sup> <i>ser</i> <sup>+</sup> <i>act</i> <sup>+</sup> <i>Aha</i> <sup>+</sup> <i>exu</i> <sup>-</sup> <i>lip</i> <sup>-</sup>	1.21 × 10 <sup>7</sup>
SN7252-4	<i>aer</i> <sup>+</sup> <i>ser</i> <sup>+</sup> <i>act</i> <sup>+</sup> <i>Aha</i> <sup>+</sup> <i>exu</i> <sup>+</sup> <i>lip</i> <sup>-</sup>	6.42 × 10 <sup>6</sup>
SC4122-5	<i>aer</i> <sup>+</sup> <i>ser</i> <sup>+</sup> <i>act</i> <sup>+</sup> <i>Aha</i> <sup>+</sup> <i>exu</i> <sup>+</sup> <i>lip</i> <sup>+</sup>	4.17 × 10 <sup>6</sup>



Nel ceppo utilizzato per la produzione del vaccino è stata evidenziata mediante PCR la presenza di 5 geni (*aer*, *act*, *aha*, *ser*, *LuxS*) su 7 (Fig. 1) seguendo la metodica di Nwaz e colleghi 2010.

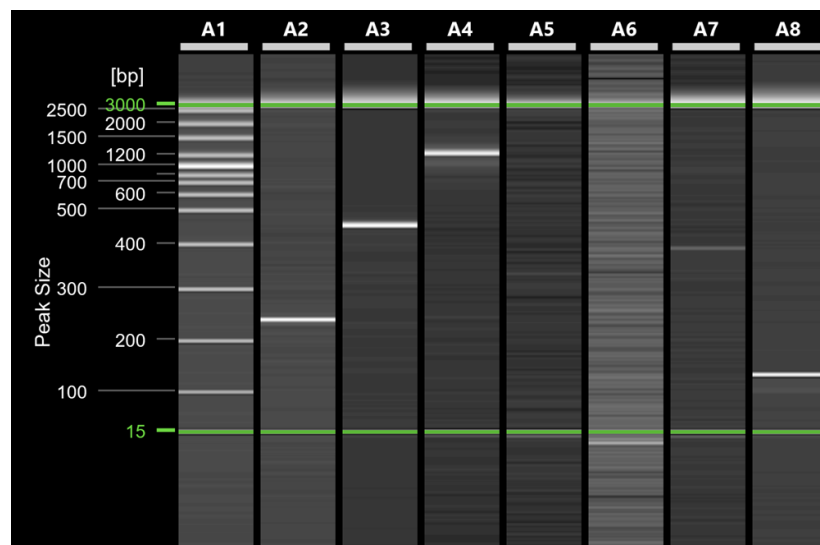


Figura 1: Geni di virulenza in *Aeromonas veronii*. Linea A1 Size marker, Linea A2 *act* (positivo), Linea 3 *aer* (positivo), Linea 4 *Aha* (positivo), Linea 5 *exu* (negativo), Linea 6 *lip* (negativo), Linea 7 *LuxS* (positivo), Linea 8 *ser* (positivo)

I ceppi con la presenza dei 4 geni messi in evidenza nel nostro caso: *act*, *aer*, *Aha*, *ser* hanno mostrato una patogenicità nel topo con dose letale 50 (LD50) di  $1,21 \cdot 10^7$  CFU/mL nello studio di Li et al., 2020.





Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

## Risultati preliminari

Al momento abbiamo analizzato 50 ceppi isolati dal Laboratorio  
di Ittiopatologia della Sezione di Pisa

Specie	Numero
Alborella ( <i>Alburnus arborella</i> )	1
Barbo ( <i>Barbus barbus</i> )	1
<i>Betta splendens</i>	1
Carassio ( <i>Carassius carassius</i> )	3
Carpa comune ( <i>Cyprinus carpio</i> )	12
Carpa koi ( <i>Cyprinus carpio koi</i> )	8
Cavedano ( <i>Squalius cephalus</i> )	3
Non identificabile	1
Pesce gatto ( <i>Ictalurus punctatus</i> )	1
Pesce gatto coda rossa ( <i>Phractocephalus hemioliopterus</i> )	1
<i>Phreatichthys andruzzii</i>	1
<i>Phtheotichthys andruzzii</i>	1
Guppy ( <i>Poecilia reticulata</i> )	1
Spigola ( <i>Dicentrarchus labrax</i> )	11
Trota ( <i>Salmo trutta</i> )	3
Trota iridea ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> )	1
<b>Totale</b>	<b>50</b>

Specie	act	aer	Aha	exu	lip	LuxS	ser
spigola ( <i>Dicentrarchus labrax</i> )	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos
carpa	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Neg	Pos
carpa	Pos	Pos	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos
trota	Pos	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos
rt aqua	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos
carpa	Pos	Pos	Neg	Neg	Pos	Neg	Pos
carpa	Pos	Pos	Pos	Neg	Neg	Neg	Pos
carpa	Pos	Pos	Neg	Neg	Pos	Neg	Pos
carassio	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Neg
alborella	Pos	Pos	Neg	Neg	Pos	Neg	Pos
carpa koi	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
carpa koi	Pos	Pos	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos
spigola	Pos	Pos	Pos	Neg	Neg	Neg	Pos
spigola ( <i>Dicentrarchus labrax</i> )	Pos	Pos	Pos	Neg	Neg	Pos	Pos
spigola ( <i>Dicentrarchus labrax</i> )	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
carpa	Pos	Pos	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos
carpa	Pos	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos
spigola ( <i>Dicentrarchus labrax</i> )	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos
spigola ( <i>Dicentrarchus labrax</i> )	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos
carpa	Pos	Pos	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos
carpa koi	Pos	Pos	Neg	Neg	Pos	Pos	Pos
<i>Poecilia reticulata</i> (guppy)	Pos	Neg	Neg	Neg	Pos	Pos	Pos
carpa	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos
non identificabile	Pos	Pos	Neg	Neg	Pos	Neg	Pos
spigola ( <i>Dicentrarchus labrax</i> )	Pos	Pos	Pos	Neg	Neg	Neg	Pos
cavedano	Pos	Pos	Pos	Neg	Neg	Neg	Pos
trota	Pos	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos
trota	Pos	Pos	Neg	Neg	Pos	Neg	Pos
pesce gatto coda rossa	Pos	Pos	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos
carpa koi	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
carassio	Neg	Pos	Neg	Neg	Pos	Neg	Pos
carassio	Neg	Pos	Neg	Neg	Pos	Neg	Pos
spigola ( <i>Dicentrarchus labrax</i> )	Pos	Pos	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg
carpa koi	Pos	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos
cavedano	Pos	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos
spigola ( <i>Dicentrarchus labrax</i> )	Pos	Pos	Pos	Neg	Neg	Neg	Pos
carpa koi	Pos	Pos	Pos	Neg	Neg	Neg	Pos
cavedano	Pos	Pos	Pos	Neg	Neg	Neg	Pos
carpa koi	Pos	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos
<i>Betta splendens</i>	Pos	Pos	Neg	Neg	Pos	Neg	Pos
barbo ( <i>Barbus barbus</i> )	Pos	Pos	Neg	Neg	Pos	Neg	Pos
spigola ( <i>Dicentrarchus labrax</i> )	Pos	Pos	Pos	Neg	Neg	Pos	Pos
carpa comune ( <i>Cyprinus carpio</i> )	Pos	Pos	Neg	Neg	Pos	Neg	Pos
carpa comune ( <i>Cyprinus carpio</i> )	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos
spigola ( <i>Dicentrarchus labrax</i> )	Pos	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos
Pesce gatto ( <i>Ictalurus punctatus</i> )	Pos	Pos	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos
carpa koi ( <i>Cyprinus carpio koi</i> )	Pos	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos
<i>Phtheotichthys andruzzii</i>	Pos	Pos	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos
carpa comune ( <i>Cyprinus carpio</i> )	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
trota iridea ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> )	Pos	Pos	Neg	Neg	Pos	Neg	Pos
<i>Phreatichthys andruzzii</i>	Pos	Pos	Neg	Neg	Pos	Neg	Pos



Il passaggio successivo sarà mettere in relazione il profilo dei geni di virulenza dei ceppi con l'isolamento:

- la specie in cui è stato isolato
- se sono state riscontrate lesioni o è un isolamento casuale
- se è stato isolato in un episodio di mortalità massiva o in un singolo animale

Questo permetterà di comprendere meglio la patogenicità dei diversi profili







Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

## Progetto Europeo *Lactococcus garvieae*

8 Maggio 2024 - 1° invito per Progetti di ricerca di collaborazione transnazionali cofinanziati dell' European Partnership on Animal Health and Welfare (EUPAHW)

EUPAHW - Partenariato Europeo sulla salute e il benessere degli animali impegnato a garantire un sistema di produzione sostenibile per gli animali terrestri e acquatici

**Scadenza 8 Luglio 2024**





Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

Consorzio composto da due Istituti Zooprofilattici Sperimentali e quattro Università di tre paesi europei tra quelli con la più alta produzione di spigole e orate

Partner 1 Coordinator (P1-C) Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana M. Aleandri - Laboratorio Produzione Vaccini (Sezione di Siena) e Laboratorio di Ittiopatologia (Sezione di Pisa)

Partner 2 (P2) Istituto Zooprofilattico delle Venezie - Centro di referenza nazionale per lo studio e la diagnosi delle malattie dei pesci, molluschi e crostacei

Partner 3 (P3) Università di Pisa - Dipartimento di Scienze Veterinarie

Partner 4 (P4) Bursa Uludag University, Turchia Faculty of Veterinary Medicine Aquatic Animal Diseases

Partner 5 (P5) Universitat de València, Spagna - Departamento de Microbiología y Ecología, Instituto Universitario en Biomedicina y Biotecnología

Partner 6 (P6) Università della Toscana - Dipartimento per l'Innovazione nei Sistemi Biologici, Agroalimentari e Forestali



Immunity stimulation by oral administration of encapsulated autologous vaccine against  
*Lactococcus garvieae* in sea bream and sea bass

ISOEAV-LG

*(Stimolazione immunitaria mediante somministrazione orale di vaccino autologo  
incapsulato contro Lactococcus garvieae nell'orata e nella spigola)*

**PROJECT DURATION**

36 Months ( 10 / 2025 to 09 / 2028 )

**TOTAL REQUESTED FUNDING**

605,090.00 €

**TOTAL COSTS**

798,000.00 €





## Prima fase

Ceppi di *L. garvieae* saranno isolati da spigole e orate e altre specie di importanza economica con segni di setticemia emorragica iperacuta

Anatomopatologico

Istologico

Isolamento del ceppo

Laboratorio Ittiopatologia IZSLT Sez. Pisa

IZSve- Centro di referenza nazionale per lo studio e la diagnosi delle malattie dei pesci, molluschi e crostacei

Laboratorio Ittiopatologia IZSLT Sez. Pisa







Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

I ceppi isolati saranno identificati e caratterizzati tramite tecnologia next-generation sequencing: permetterà di capire l'architettura genica e il potenziale patogenico  
Saranno sviluppate metodiche veloci ed utilizzabili per caratterizzare i ceppi prima della produzione dei vaccini

Bursa Uludag University, Turchia Faculty of Veterinary  
Medicine Aquatic Animal Diseases

I ceppi saranno caratterizzati anche sierologicamente (capsulated (KG-) e non-capsulated (KG+))  
Saranno effettuate prove in spigole ed orate e nel topo per valutare la patogenicità *in vivo*

Universitat de València, Spagna - Departamento de  
Microbiología y Ecología, Instituto Universitario en Biomedicina  
y Biotecnología





Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

## Seconda fase

Dai ceppi così caratterizzati sarà prodotto un vaccino autologo inattivato, adiuvato con diversi adiuvanti, e incapsulato per somministrazione per via orale con il mangime

Laboratorio Produzione Vaccini IZSLT Sez. Siena

Subcontractors nella Pre-proposal



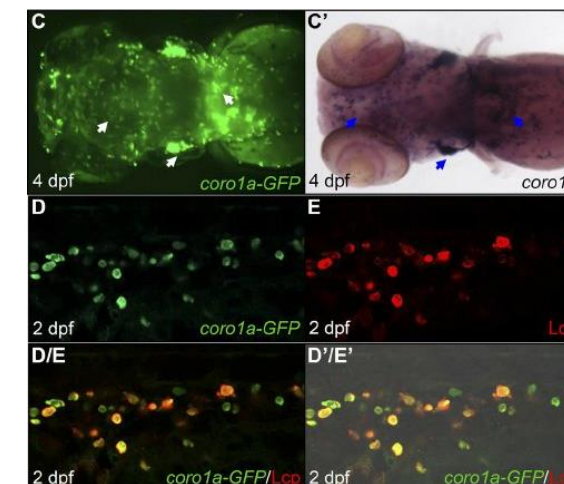
Il mangime con il vaccino incapsulato sarà confrontato con le altre vie di somministrazione:

- in linee di Zebrafish che presentano **macrofagi e neutrofili** luminescenti per valutare l'efficacia della somministrazione per via orale e la stimolazione del sistema immunitario a livello intestinale

Università di Pisa - Dipartimento di Scienze Veterinarie

- in spigole e orate in cui sarà valutata la produzione e la persistenza di anticorpi specifici (IgM) verso *L. garvieae*, la presenza di cellule B della memoria a lungo termine e l'espressione genica del sistema immunitario mucosale (intestino) e sistemico (rene anteriore e milza)

Università della Tuscia - Dipartimento per l'Innovazione nei  
Sistemi Biologici, Agroalimentari e Forestali



Li e Yu, 2012



## Pre-Proposal Evaluation Report

- 1) **Eccellenza:** il progetto ISOEAV-LG offre un forte valore scientifico concentrandosi sulla patogenicità del *Lactococcus garvieae* e mirando a sviluppare un vaccino orale per specie ittiche commercialmente importanti come il branzino europeo e l'orata. L'uso del *Danio rerio* come organismo modello è innovativo e i metodi di vaccinazione orale sono degni di nota. Il progetto è in linea con l'azione OO5-azione 3 di SRIA, affrontando sfide critiche per la salute degli animali. Tuttavia, fornire una maggiore giustificazione per i livelli di salinità e i gruppi di controllo migliorerebbe la chiarezza del progetto. **Punteggio: 5**
- 2) **Impatto:** la proposta di progetto è stata valutata come avente un potenziale significativo nel contribuire a strategie per ridurre l'uso di antibiotici e prevenire perdite economiche nell'acquacoltura. In termini di impatto, il progetto potrebbe giovare al benessere degli animali e alla sostenibilità. ***Il progetto prevede di coinvolgere partner industriali come subappaltatori. Tuttavia, è stato sottolineato che sono necessarie strategie di collaborazione industriale più forti per un impatto maggiore.*** **Punteggio: 4**
- 3) **Qualità ed efficienza dell'implementazione:** il progetto presenta un piano di lavoro ben strutturato con una chiara divisione dei compiti tra i partner internazionali. ***Includere i partner industriali come subappaltatori potrebbe aumentare il potenziale di commercializzazione.*** La cronologia e le descrizioni delle attività potrebbero essere più dettagliate e si raccomandano strategie di collaborazione più forti con l'industria dell'acquacoltura. **Punteggio: 4,3**
- 4) **Punti di forza e di debolezza:** la proposta presenta metodi di vaccinazione orale innovativi, elevata rilevanza scientifica e forte collaborazione internazionale, ***ma mancanza di partner diretti dell'industria dell'acquacoltura***, un piano di comunicazione incompleto e dettagli poco chiari sui livelli di salinità. **Punteggio complessivo: 13,3**





Table 3 Prevalence of virulence-related genes of *L. garvieae* isolated from cultured mullet in Korea

Virulence genes	No. of isolates	%
<i>hly I</i>	94	99.00
<i>hly III</i>	93	97.90
<i>adhPav</i>	86	90.60
<i>adhPsaA</i>	89	93.70
<i>adhCII</i>	90	94.80
<i>LPxTG-3</i>	91	95.80
<i>SOD</i>	88	92.70
<i>PG</i>	88	92.64
<i>ENO</i>	94	98.95
<i>NADH oxidase</i>	93	97.90

Mugil cephalus, cefalo, Korea

Majeed et al., 2024

Table 5. Putative Virulence Gene Detection results of 49 *L. garvieae* isolates.

Genes	Number of Positives	Percentage Positive
<i>hly1</i>	49	100.00%
<i>hly2</i>	48	97.96%
<i>hly3</i>	0	0.00%
<i>NADHO</i>	49	100.00%
<i>SOD</i>	49	100.00%
<i>pgm</i>	15	30.61%
<i>Pav</i>	49	100.00%
<i>PsaA</i>	49	100.00%
<i>eno</i>	49	100.00%
<i>LP1</i>	0	0.00%
<i>LP2</i>	0	0.00%
<i>LP3</i>	11	22.45%
<i>LP4</i>	0	0.00%
<i>AC1</i>	49	100.00%
<i>AC2</i>	49	100.00%
<i>Adh</i>	0	0.00%
1020-F, 1323-R	2	4.08%
851-F, 1399-R	0	0.00%
6329-F, 7175-R	24	48.98%
5358-F, 6007-R	0	0.00%
<i>CHP</i>	44	89.80%
<i>EpsA</i>	49	100.00%
<i>EpsB</i>	46	93.88%
<i>EpsC</i>	49	100.00%
<i>EpsD</i>	35	71.43%
<i>EpsL</i>	42	85.71%
<i>EspR</i>	49	100.00%
<i>EspX</i>	49	100.00%
<i>ORUP</i>	0	0.00%
<i>RIF</i>	29	59.18%
<i>30S gene</i>	49	100.00%

Mastiti bovine, Cina

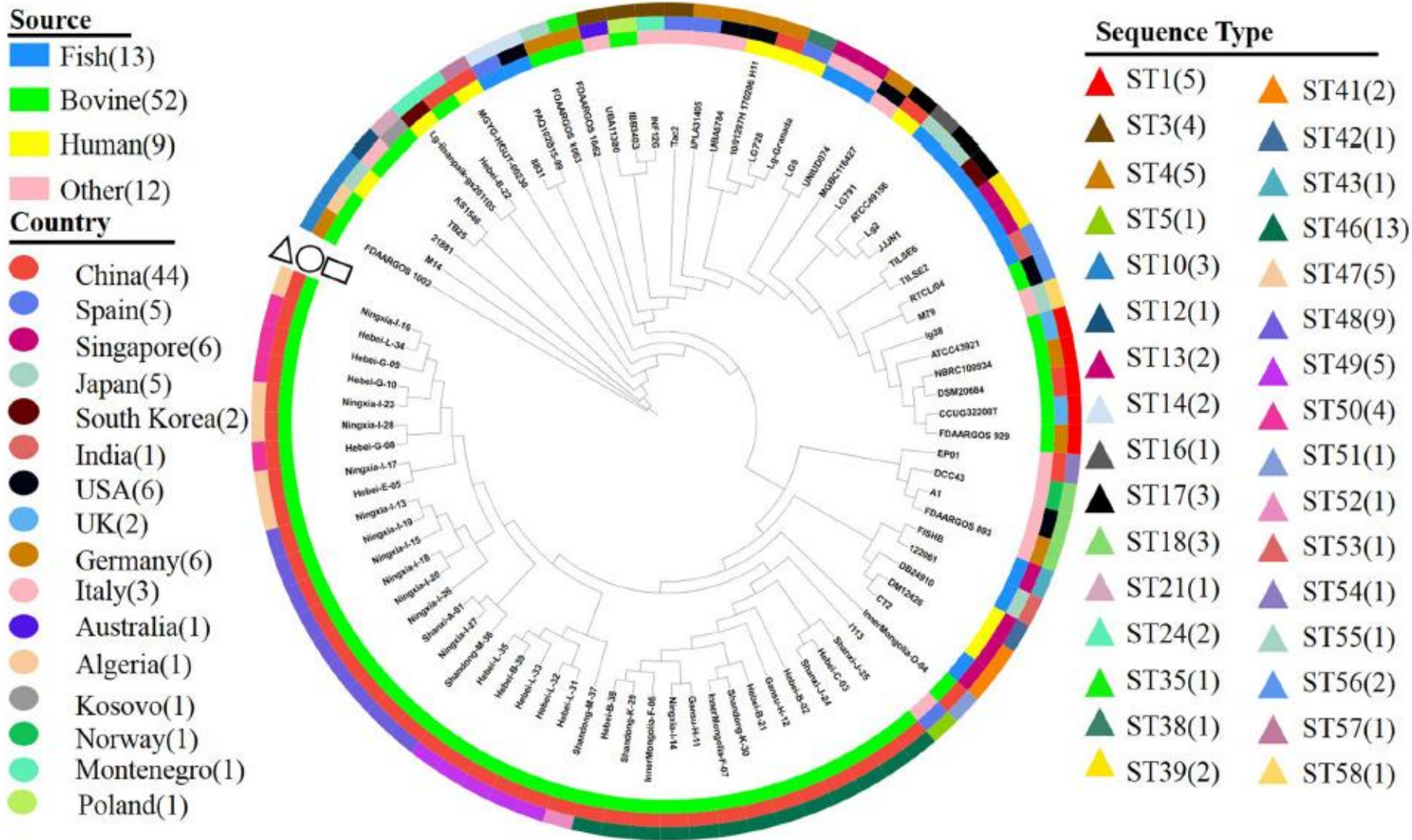
Xie et al., 2023

Table 4. Presence of virulence genes in *Lactococcus garvieae* isolates and the *L. lactis* isolate. Hemolysins 1, 2, and 3, NADH oxidase, phosphoglucomutase, adhesin Pav, LPxTG-containing surface proteins 2 and 3 (where LPxTG means Leu-Pro-any-Thr-Gly), superoxide dismutase, adhesin PsaA, enolase, and adhesin clusters 1 and 2 were found in all isolates. '+' indicates gene is present; '-' indicates gene is absent

Isolate	Gene(s)			
	Capsule gene cluster	Adhesin	LPxTG-1	LPxTG-4
Lg2	+	+	+	+
225-1	-	+	-	+
399-18	-	+	+	-
637-5	-	+	-	-
671-14	-	-	-	-
K9	-	+	-	-
Kalis	-	-	-	-
235-16	-	-	-	+
M1	-	+	-	+
M2	-	+	-	+
M3	-	+	-	-
Lgper	-	+	-	-
A30	-	+	-	-
Sider17	-	+	-	-
OM	-	+	-	-
Iysaf	-	+	-	+
Ser114	-	+	+	-
Trb	-	+	-	+
Akoluk	-	-	-	-
Trb-2	-	-	-	-
2398	-	+	+	-
I2015	-	-	-	-
M300	-	+	+	-
A-58	-	+	-	-
G-27	-	+	+	-
PP6O	-	+	-	-
ATCC49156	-	+	+	+
1684	-	+	+	+
164A/03	-	+	+	+
8053	-	+	+	-
532	-	+	+	+
FTPI	-	+	+	+
498	-	+	+	+
ATCC43921	-	-	-	-
<i>L. lactis</i>	-	-	-	+

Trota iridea, Turchia

Ture and Haltinok, 2016



**FIG 6** Phylogenetic tree based on core genome single nucleotide polymorphism of 86 *Lactococcus garvieae* isolates. Shown are the source of the host (4 hosts [the first ring, indicated by rectangles]) and country (16 countries [the second ring, indicated by circles]), as well as sequence types (STs) (32 STs [the outermost ring, indicated by triangles]), of 86 *Lactococcus garvieae* isolates.



Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

**S. aureus**



***animals***



*Article*

# **An Investigation of Virulence Genes of *Staphylococcus aureus* in Autologous Vaccines Against Sheep Mastitis**

Vi ringrazio dell'attenzione e lascio la parola

