

**Studio sulla bioassimilabilità orale di un vaccino
anti-*Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*
nella spigola (*Dicentrarchus labrax*)**

*Evaluation of bioavailability of an oral vaccine against
Photobacterium damsela subsp. piscicida in reared sea bass
(Dicentrarchus labrax)*

**Elisabetta Manuali¹, Cinzia Tiberi¹, Alessandra Di Salvo², Francesco Agnetti¹,
Giorgia della Rocca², Claudio Ghittino¹, Josè Malvisi^{2*}**

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, via G. Salvemini, 1 - 06126 Perugia;

² Università degli Studi di Perugia, Dipartimento di Patologia, Diagnostica e Clinica Veterinaria, Sezione di Scienze Sperimentali e Biotecnologie Applicate, via S. Costanzo, 4 - 06126 Perugia.

RIASSUNTO - La Fotobatteriosi (ex Pasteurellosi) dei pesci, sostenuta dal germe Gram negativo *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (*Phdp*), è causa di elevata mortalità in molte specie ittiche marine. Recentemente, numerosi tentativi sono stati fatti per controllare la malattia con la formulazione (e valutazione dell'efficacia) di vaccini sperimentali attraverso varie vie di somministrazione. A differenza di quanto si realizza con le tecniche finora in uso, è riconosciuto come la via orale sia ottimale in ragione di una mancata induzione stressogena negli animali e una forte incidenza sul miglioramento del benessere animale. A tal fine, si stanno sperimentando tecniche di microincapsulazione aventi la funzione di rilasciare l'antigene nel tratto intestinale posteriore, zona di massimo assorbimento nelle specie ittiche, evitando possibili fenomeni di inattivazione chimica (pH) o enzimatica (proteasi) nel tratto gastro-enterico. Uno dei metodi atti a svelare la capacità di assorbimento tissutale del vaccino si avvale di indagini immunostochimiche che permettono di dimostrare l'effettiva presenza dell'antigene nel soggetto vaccinato. Scopo del presente lavoro è stato quello di determinare la bioassimilabilità orale di due tipologie di vaccino microincapsulato anti-*Phdp* in spigole d'allevamento (*Dicentrarchus labrax*), attraverso metodiche immunostochimiche ed immunocitochimiche atte a valutare l'eventuale presenza tissutale dell'antigene e la sua distribuzione cellulare. Le indagini di microscopia ottica ed elettronica hanno evidenziato la presenza dell'antigene vaccinale all'interno degli enterociti, dimostrandone la capacità di assorbimento da parte delle cellule epiteliali intestinali, stazionando all'interno di formazioni vacuolari di probabile origine fagosomiale.

SUMMARY – *Fish Photobacteriosis (ex Pasteurellosis), caused by Gram negative Photobacterium damsela subsp. piscicida (Phdp), is responsible for high mortality episodes in several marine fish species. Recently, many attempts were performed to control the disease by the formulation of experimental vaccines, supplied through different ways, and the evaluation of their efficacy. It is largely known that the oral administration is optimal, since it is characterized by absent stress induction in animals, great incidence on the increasing of the animal wellness, complete clinical efficacy and then good resolution of the wellness status of farmed fish. With this aim, microencapsulated vaccines are studied, because of their capability to release the antigen in the posterior intestine (site of great assimilation in fish) and to avoid its chemical (pH) or enzymatic (proteases) inactivation by the gastric district. Immunohistochemical method is able to discover the vaccine intestinal assimilation and detect the effective antigen presence into the vaccinated animal. With this work the Authors determined the oral bioavailability of two kinds of microencapsulated vaccines anti-Phdp in Dicentrarchus labrax, through immunohistochemical and immunocytochemical methods, with the aim of evaluate the antigen presence into the tissue and its cellular distribution. Light and electron microscopy examinations revealed the presence of vaccine antigen into the enterocytes, with sequent localization into probable phagosomal vacuoles.*

Key words: Photobacteriosis, *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, Vaccination, Oral administration.

* Corresponding Author: c/o Università degli Studi di Perugia, Dipartimento di Patologia, Diagnostica e Clinica Veterinaria, Sezione di Scienze Sperimentali e Biotecnologie Applicate, via S. Costanzo, 4 - 06126 Perugia. Tel.: 075-5854411; E-mail: malvisi@unipg.it.

INTRODUZIONE

La Fotobatteriosi (ex Pasteurellosi) dei pesci, sostenuta da *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (*Phdp*), è una malattia infettiva che evolve in forma sistemica, a decorso acuto (Roberts, 2001), causando numerosi episodi di mortalità in molte specie ittiche marine, selvatiche e non (Lewis *et al.*, 1970; Babelona *et al.*, 1992). Nell'ultimo ventennio, tale patologia si è diffusa anche nell'area mediterranea, coinvolgendo specie ittiche marine d'allevamento, prima tra tutte la spigola (*Dicentrarchus labrax*), in Francia, Italia e Spagna (Ceschia *et al.*, 1991; Magariños *et al.*, 1995; Romalde, 2002; Ghittino *et al.*, 2003).

Phdp è un germe Gram negativo appartenente alla famiglia delle Vibrionaceae e risulta patogeno a temperature dell'acqua superiori ai 18°C (Austin & Austin, 1999). Il decorso della malattia è quello di una setticemia in forma acuta, con sintomi clinici generici (anoressia, letargia) e poco evidenti; le lesioni anatomopatologiche sono rappresentate da formazioni nodulari granuloma-like (da qui il nome di Pseudotubercolosi con cui si può anche indicare la malattia), particolarmente evidenti su milza e rene, a cui può accompagnarsi la presenza di materiale simil-purulento nella cavità celomatica (Austin & Austin, 1999).

La Fotobatteriosi è una malattia che interessa essenzialmente il novellame, rappresentando un serio problema sanitario delle avannotterie marine, laddove può indurre tassi di mortalità del 70-80%; il controllo si basa essenzialmente sull'impiego di mangime medicato (sulfamidico potenziato e flumechina hanno buona efficacia) nonché della vaccinazione per immersione (che a tutt'oggi risulta ancora di efficacia ridotta) (Ghittino *et al.*, 2003). Sebbene numerosi siano gli studi circa la valutazione dell'efficacia di metodiche vaccinali per immersione o per via endoperitoneale (Anderson, 1997; Evensen, 2003; Afonso *et al.*, 2005), è sempre più interesse comune, anche nei riguardi della Fotobatteriosi, la possibilità di impiego di presidi immunizzanti somministrabili per via orale (Manganaro *et al.*, 1994).

Nella pratica piscicoltura, infatti, tale via di somministrazione presenta sicuramente dei vantaggi (Smith, 2002) sintetizzabili in:

- a) riduzione dello stress indotto dalle manipolazioni;
- b) miglioramento dello stato di benessere animale;
- c) contribuzione all'efficacia clinica nei pesci oggetto di immunizzazione.

Le conoscenze dei meccanismi coinvolti nell'assunzione dell'antigene a seguito di vaccinazione orale sono ancora incomplete. Tuttavia, alcuni Autori ritengono che il primo contatto con i patogeni avverrebbe attraverso la superficie della mucosa e che la presenza di un sistema immunitario locale, ormai inconfutabile, rappresenterebbe un approccio al passaggio dell'antigene attraverso le superfici cellulari (Dogget & Harris, 1991; Dalmo *et al.*, 1995). A tale riguardo, le ricerche effettuate sono state rivolte a preservare l'antigene dall'attacco di enzimi e dall'azione del pH in sede gastrica (Joosten *et al.*, 1997).

Scopo del presente lavoro è stato quello di valutare la bioassimilabilità orale di un vaccino anti-*Phdp* nella spigola, con la finalità di studiarne l'assorbimento orale mediante tecniche di microincapsulazione (per evitare alterazioni dell'antigene fino al suo arrivo nell'intestino posteriore) ed evidenziare la presenza dell'antigene vaccinale all'interno degli enterociti mediante reazioni immunoistochimiche ed immunocitochimiche.

MATERIALI E METODI

Animali utilizzati ed interventi vaccinali effettuati

Per la realizzazione del presente studio sono stati impiegati esemplari di spigola del peso di 150 g. circa, acclimatati per circa due settimane in 3 vasche di vetroresina (4 m di lunghezza

x 80 cm di larghezza x 60 cm di profondità), con flusso idrico in entrata di 2-3 l/sec, dotate di ossigenatori e poste all'interno di una serra del Centro Ittico Sperimentale "Bonello" (Porto Tolle, RO), nel quale è stata effettuata la sperimentazione vaccinale. In ciascuna vasca sono state ospitate 150 spigole.

I pesci di ogni vasca sono stati lasciati a digiuno nelle 48 ore precedenti alla somministrazione del vaccino, allestito dal Dipartimento di Scienze Animali di Udine.

In breve, il ceppo batterico, fornito dal Centro di Referenza Nazionale per lo Studio e la Diagnosi delle Malattie dei Pesci, Molluschi e Crostacei (IZS delle Venezie, Legnaro, PD) è stato conservato in Tryptic Soy Agar con il 2% di NaCl. I batteri sono stati inoculati in 10 ml di TSB + 2% NaCl e, raggiunta la fase logaritmica di crescita, passati in un volume di terreno (1 litro) alla temperatura di incubazione di 23°C. La sospensione è stata fissata overnight sotto agitazione con formalina allo 0,6% e centrifugata 3 volte (3000 rpm per 60 minuti) con PBS sterile. Il sedimento ottenuto è stato risospeso in PBS sterile (~50 ml/l di brodocoltura iniziale), sottoposto a controllo di sterilità e conservato a -20°C in vaschette di alluminio. A seguito della liofilizzazione il ceppo batterico è stato raccolto e conservato a -20°C fino alla microincapsulazione, effettuata da Shoreline Scarl - Area Science Park - Trieste, che ha formulato due microincapsulati così distinti:

- PPO3-UD: 30,45 g. - granulometria finale < a 50 µ e rapporto preparato batterico/matrice pari a 1:1;
- PPO4-UD: 29,10 g. - granulometria finale < a 50 µ e rapporto preparato batterico/matrice pari a 1:1.

Gli interventi vaccinali sono stati condotti secondo lo schema seguente:

- Vasca 1 - 150 spigole trattate con vaccino microincapsulato PPO3-UD, somministrato per via orale integrato al mangime commerciale (di seguito definito matrice 1);
- Vasca 2 - 150 spigole trattate con vaccino microincapsulato PPO4-UD, somministrato per via orale integrato al mangime commerciale (di seguito definito matrice 2);
- Vasca 3 - 150 spigole (gruppo controllo), non vaccinate ed alimentate soltanto con mangime commerciale.

L'intero programma vaccinale ha seguito il seguente iter: T₀ o prima vaccinazione della durata di 5 giorni, pausa di 5 giorni e T₁ o richiamo vaccinale della durata di 5 giorni.

Le vaccinazioni (sia il primo trattamento sia il richiamo) sono state condotte alimentando le spigole delle vasche 1 e 2 per 10 giorni con 150 g./giorno/vasca di mangime integrato al vaccino. Nel corso di tutti gli interventi vaccinali la temperatura dell'acqua si è mantenuta costantemente a 24,6°C e la concentrazione di ossigeno nelle vasche è variata da 6,4 a 8,1 ppm.

Prelievo dei campioni per indagini immunoistochimiche ed immunocitochimiche

Il prelievo dei campioni, effettuato al termine di ogni fase di vaccinazione (T₀ e T₁) nelle vasche sperimentali e nella vasca controllo, è stato condotto utilizzando ogni volta 10 soggetti per vasca. Gli animali sono stati sacrificati con overdose di anestetico e di seguito sottoposti ad esame anatomopatologico per evidenziare l'eventuale presenza di lesioni riferibili a Fotobatteriosi o, più in generale, di alterazioni macroscopiche. Per ogni soggetto

sono stati poi prelevati campioni di rene, milza ed intestino posteriore, principale sito di assorbimento di molecole antigenicamente intatte (Ellis, 1998).

Le indagini immunoistochimiche (IIC) sono state effettuate previa fissazione degli organi in formalina tamponata al 10%, disidratazione ed inclusione in paraffina seguendo le metodiche di routine. Dai blocchetti in paraffina sono state ottenute sezioni seriali di 4-5 μm di spessore fatte aderire su vetrini polilisinati e di seguito sottoposte ad inibizione delle perossidasi endogene con H_2O_2 al 0,3% in metanolo, per i campioni di intestino e al 10% per i campioni di milza e rene. Lo smascheramento dell'antigene è stato effettuato utilizzando un forno a microonde (750-650-500 W da 5 minuti ognuno) immergendo i preparati in tampone citrato; i campioni sono stati fatti raffreddare e circoscritti con PAP pen. Sulle sezioni è stato applicato sia un anticorpo primario monoclonale (Aquatic Diagnostic Ltd., Stirling, UK), diluito 1:20 in PBS, sia un anticorpo primario policlonale (Microtek Int., Canada), a varie diluizioni, entrambi incubati per 2 ore a temperatura ambiente ed in camera umida. La reazione è stata infine svelata mediante il sistema Universal Dako Cytomation LSAB[®]+ Kit, Peroxidase (LSAB+Kit, HRP). Dopo lavaggi in PBS, è stata utilizzata la 3,3'-diaminobenzidina (DAB) come substrato cromogeno, seguita da contro-colorazione dei nuclei con Ematossilina di Mayer per 3 minuti. Come controllo positivo di reazione è stato impiegato un campione di milza con lesioni granulomatose pseudotubercolari risultato positivo all'esame batteriologico per *Phdp*. Nel controllo negativo l'anticorpo primario è stato sostituito con PBS. Per le indagini immunocitochimiche (ICC), piccoli frammenti di campione sono stati fissati in paraformaldeide al 4% e glutaraldeide allo 0,5% per 2 ore a 4°C. L'inclusione dei pezzi è stata effettuata utilizzando la resina acrilica London White Resin (LRWhite) (TAAB, England), polimerizzata in UV per 48 ore, applicando la tecnica post-embedding. Sulle sezioni semifini, colorate con blu di toluidina, sono state identificate le porzioni di tessuto da sottoporre alle successive indagini ultrastrutturali, utilizzando sezioni ultrafini poste su griglie di nichel da 150 mesh. Il blocco dei legami aspecifici è stato ottenuto applicando sulle sezioni Normal Goat Serum (NGS) diluito 1:100 in tampone fosfato PBS, seguito dall'incubazione con l'anticorpo primario per 2 ore a temperatura ambiente utilizzato tal quale (non diluito). Dopo successivi lavaggi in PBS-Tween e PBS, sulle sezioni è stato nuovamente applicato NGS diluito 1:100 per 3 minuti e quindi l'anticorpo secondario (monoclonale di capra anti-topo, diluito 1/10 in PBS) coniugato a particelle di oro colloidale del diametro di 10 nanometri (GAM_{10nm}, Sigma-Aldrich). Dopo lavaggi in PBS ed in acqua distillata ultrapura, le sezioni sono state lasciate asciugare tutta la notte ed il giorno dopo contrastate con acetato di uranile. Per verificare l'affidabilità della metodica, la stessa procedura è stata applicata al controllo positivo rappresentato da frammenti di milza di altra provenienza, appartenenti ad animali sicuramente infetti e sottoposti alla stessa procedura di inclusione. Come controllo negativo invece (per testare la specificità dell'anticorpo secondario) sono state utilizzate sezioni incubate con una goccia di tampone fosfato PBS in sostituzione dell'anticorpo primario.

RISULTATI

I risultati relativi alle indagini IIC sono sintetizzati nella Tabella 1. In tutti i gruppi sperimentali, a seguito della prima somministrazione vaccinale non è stata riscontrata positività per l'antigene ricercato in tutti gli organi prelevati. Il richiamo vaccinale ha invece evidenziato positività (marcatura immunoistochimica) soltanto nel tratto digerente, resa evidente da una colorazione marrone in corrispondenza dell'avvenuta reazione antigene-anticorpo. In particolare, per le matrici vaccinali 1 e 2, la positività dei soggetti vaccinati è

stata rispettivamente del 90% e del 100%. Milza e rene anteriore sono risultati invece negativi.

	CONTROLLO	MATRICE 1		MATRICE 2	
		1 ^a somm.ne vaccino orale (%)	Richiamo vaccino orale (%)	1 ^a somm.ne vaccino orale (%)	Richiamo vaccino orale (%)
Intestino posteriore	Negativo	Negativo	Positivo 9/10 (90%)	Negativo	Positivo 10/10 (100%)
Milza	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Rene anteriore	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

Tabella 1 - Risultati relativi all'indagine immunocistochemica.
Table 1 – Immunohistochemistry results.

Nei campioni positivi, si sono evidenziati clusters di germi, generalmente localizzati nella porzione apicale degli enterociti, con disposizione a filiera e associati alla presenza di formazioni vacuolari singole o multiple, inglobanti i frammenti batterici (Figure 1A e B). La validità della metodica è stata saggiata utilizzando un controllo positivo di reazione, rappresentato da campioni di milza appartenenti a soggetti colpiti da infezione naturale; in tale controllo la positività ottenuta attraverso l'impiego dell'anticorpo Aquatic Diagnostic Ltd., si è rilevata in corrispondenza delle lesioni granulomatose sotto forma di grossi aggregati batterici localizzati sia al centro che alla periferia dei granulomi (Figura 1C). Nel controllo negativo, per il quale è stata usata la soluzione tampone PBS al posto dell'anticorpo primario, non si è osservata alcuna positività. La riproducibilità della metodica, definita come la capacità di ottenere lo stesso risultato nelle stesse condizioni in tempi, luoghi ed operatori diversi, è stata del 100% su 900 repliche.

L'anticorpo Microtek ha invece dimostrato scarsa sensibilità e per tale motivo è stato deciso di non utilizzarlo nelle indagini ultrastrutturali di tipo immunocistochemico.

L'osservazione al microscopio elettronico dell'intestino proveniente dai gruppi sperimentali evidenziava delle differenze, sia a livello morfologico che immunocistochemico.

Al fine di apprezzare le variazioni ultrastrutturali osservate, si ritiene utile indicare gli aspetti fisiologici degli enterociti in pesci sani: questi presentano la tipica forma cilindrico-prismatica, con superficie libera composta di microvilli, al di sotto dei quali è presente un sottile strato compatto, per lo più privo di organelli, definito "trama terminale" o "terminal web". Sotto tale trama, nel citoplasma apicale, si possono osservare numerosi mitocondri di forma allungata associati alla presenza del reticolo endoplasmatico rugoso (RER) in quantità variabile. Il nucleo delle cellule assorbenti si trova nella parte basale della cellula e presenta una forma allungata. Nel citoplasma basale i mitocondri sono piuttosto scarsi mentre si osservano numerosi ribosomi liberi e un apparato di Golgi ben sviluppato, situato in genere nel polo apicale del nucleo. La base delle cellule assorbenti riposa su una sottile lamina basale. Intercalate irregolarmente tra gli enterociti sono inoltre osservabili le cellule calciformi.

I vacuoli sono stati ritrovati anche negli enterociti di pesci provenienti dalla vasca controllo (cl clinicamente sani), ma in questo caso erano collocati soprattutto nel citoplasma basale e presentavano dimensioni inferiori rispetto a quelli osservati nei soggetti delle vasche precedenti. Occasionalmente, vacuoli di piccole dimensioni sono stati evidenziati anche all'interno della trama terminale. I vacuoli risultavano per lo più vuoti e raramente contenevano materiale di natura amorfa, come quello osservato nelle vasche 1 e 2.

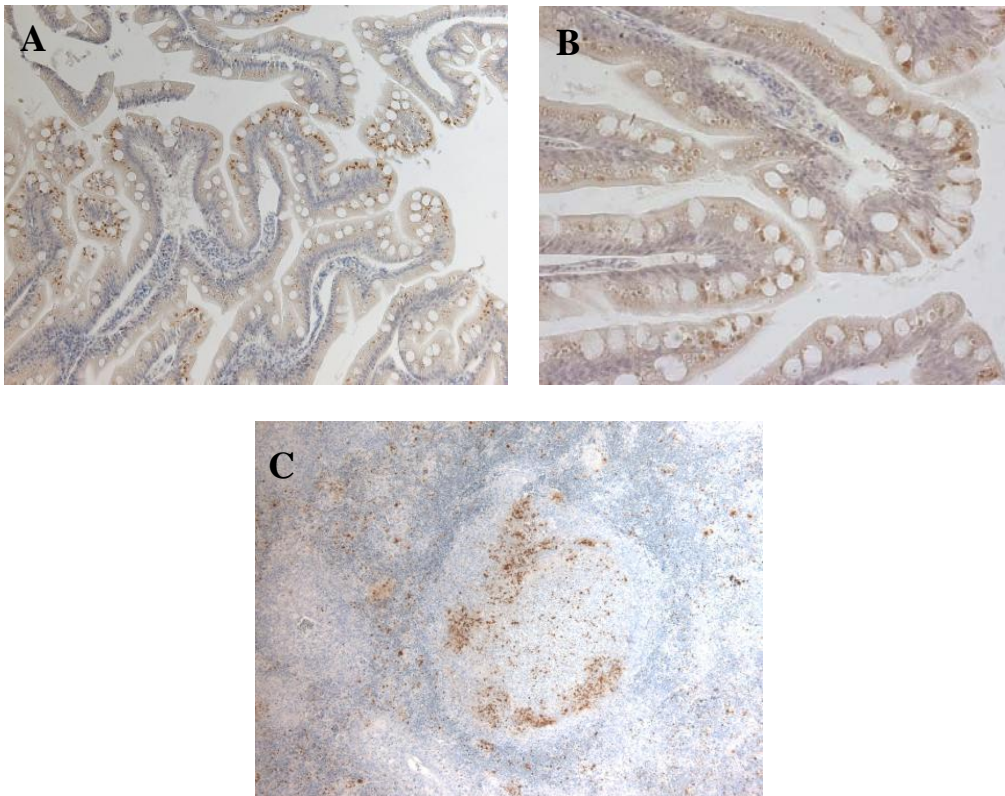


Figura 1 – A) Intestino posteriore. Positività immunohistochimica localizzata nella porzione apicale dei villi, evidenziata dalla colorazione marrone (IHC x 10). B) Particolare della figura precedente. Presenza dell'antigene vaccinale sia all'interno che in corrispondenza del bordo vacuolare (IHC x 40). C) Controllo positivo. Milza. Granuloma con numerosi clusters batterici (IHC x 20).

Figure 1 – A) Posterior intestine: immunohistochemistry positivity at the top of intestinal villi (IHC x 10). B) Previous picture magnification: presence of vaccine antigen inside and on the border of a vacuole (IHC x 40). C) Spleen positive control granuloma with several bacterial clusters (IHC x 20).

I risultati delle indagini ICC hanno confermato quanto evidenziato attraverso le prove di microscopia ottica. La positività per l'antigene vaccinale è stata svelata dalla presenza di grani di oro colloidale riscontrati nel materiale di natura amorfa contenuto all'interno e sul bordo dei vacuoli (Figure 2D, E ed F), in accordo con i risultati ottenuti dalle analisi immunohistochimiche.

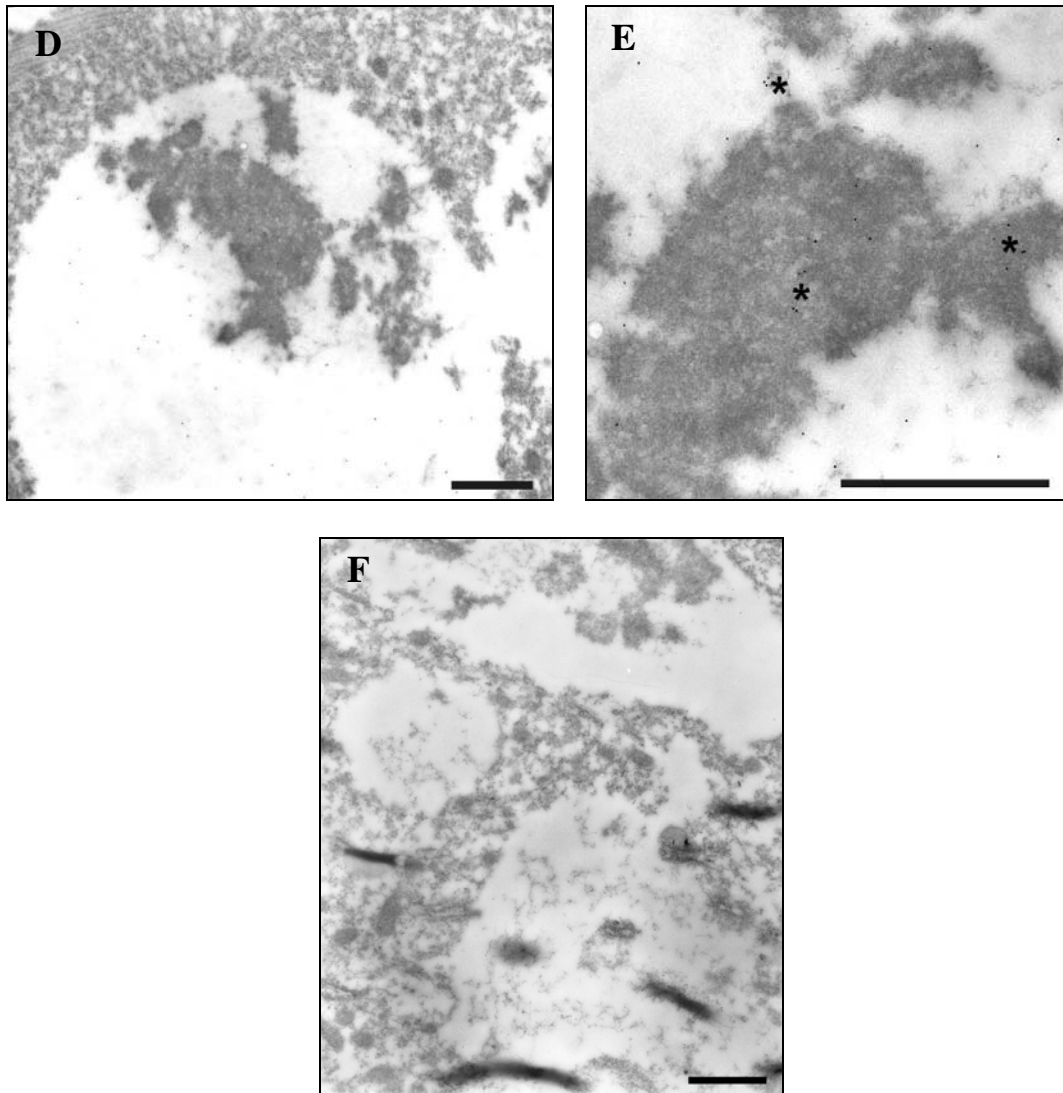


Figura 2 – D) Intestino posteriore. Aspetto ultrastrutturale della frazione batterica contenuta all'interno di un vacuolo (TEM, Bar 1 μm). E) Particolare della figura precedente. Immunomarcatura con anticorpo anti *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida*, indicato dalla presenza di grani di oro colloidale (asterischi) (TEM, ICC, Bar 1 μm). F) Intestino posteriore. Campione di controllo nel quale è stato omesso l'anticorpo primario (TEM, ICC, Bar 1 μm).

Figure 2 – D) Posterior intestine: ultrastructural feature of the bacterial fragment within a vacuole (TEM, Bar 1 μm). E) Previous picture magnification: immunolabelling with an anti *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida* antibody, indicated by the presence of colloidal gold granules (black marks) (TEM, ICC, Bar 1 μm). F) Posterior intestine: control sample without primary antibody (TEM, ICC, Bar 1 μm).

Per stabilire una quantificazione della reazione immunocitochimica sono stati presi in considerazione i seguenti parametri, resi evidenti in ogni campo visivo:

- assente (grani non presenti);
- debole (fino a 5 grani);
- medio (da 5 a 10 grani);
- elevato (oltre 10 grani).

Il background della reazione è stato valutato osservando il numero di grani d'oro colloidale eventualmente presenti nella resina attorno alla sezione tissutale, nel nucleo e negli organuli citoplasmatici. L'assenza di marcatura è stata riscontrata nei campioni del gruppo controllo (vasca 3), mentre un'elevata positività è stata evidenziata nei campioni appartenenti agli esemplari delle vasche 1 e 2.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

La Fotobatteriosi dei pesci, sostenuta da *Phdp*, è a tutt'oggi causa di elevata mortalità negli allevamenti intensivi di molte specie ittiche marine, prima tra tutti la spigola. Le metodiche di controllo della malattia si stanno sempre più orientando verso la profilassi indiretta ed in particolare, verso l'impiego di presidi vaccinali in formulazione orale, al momento impiegati al solo scopo sperimentale. Quest'i ultimi infatti, rappresenterebbero un'alternativa interessante ai comuni metodi di vaccinazione (per inoculazione o per immersione), in quanto potenzialmente meno stressanti per i pesci, meno impegnativi dal punto di vista dell'impiego di risorse umane e più efficaci nel garantire lo stato di benessere degli animali allevati (Smith 2002). Inoltre, il distretto intestinale posteriore è riportato in letteratura come il principale sito di assorbimento antigenico, sia per le diverse specie ittiche, sia in pesci di diversa età (Olafsen & Hansen, 1992; Bogwald *et al.*, 1994; Quentel & Vigneulle, 1997). In tale contesto si inserisce il presente studio, nel quale è stata valutata la capacità di assorbimento in sede intestinale (bioassimilabilità) di un vaccino orale microincapsulato anti-*Phdp* per la spigola. Precedenti ricerche hanno già dimostrato che l'intestino è un organo attraverso il quale si può realizzare l'infezione naturale (Kawahara *et al.*, 1989) e che tecniche anticorpali in fluorescenza possono svelare la presenza di cellule inattive di *Phdp* assorbite all'epitelio intestinale (Kawahara & Kusuda, 1988).

Le indagini da noi condotte hanno consentito di verificare la presenza dello stipite vaccinale negli enterociti dimostrandone la permanenza in formazioni vacuolari di probabile origine fagosomiale. Le indagini ultrastrutturali hanno evidenziato la presenza di elementi batterici disgregati, privi della tipica morfologia bastoncellare e caratterizzati da una matrice amorfa disomogenea. La presenza antigenica è stata rilevata soltanto nello strato epiteliale dell'intestino, mentre le cellule macrofagiche, pur diffusamente presenti nella lamina propria dei villi e nello strato sottomucoso, sono comunque risultate prive di elementi antigenici. I campioni splenici e renali analizzati, sono anch'essi risultati negativi. Tale condizione potrebbe essere imputabile ad una mancata o molto ritardata veicolazione dell'antigene dagli enterociti alle componenti cellulari sopra citate. Tuttavia, risposte immunitarie sistemiche sono state descritte a seguito di vaccinazione anti-Vibriosi per via anale od orale nella carpa e nell'orata (Georgopoulou & Vernier, 1986; Rombout & Van Berg 1989; Rombout *et al.*, 1989; Joosten *et al.*, 1995; 1996; Rombout *et al.*, 1997). In particolare, Joosten *et al.*, 1997, con l'impiego di un vaccino orale anti-Vibriosi incluso in microsferi di alginato, hanno dimostrato la produzione mucosale di IgM a livello intestinale sia nella carpa che nella trota.

In conclusione si può affermare che la microincapsulazione del vaccino anti-*Phdp* si dimostra un metodo promettente per la vaccinazione orale nelle specie ittiche d'allevamento, ma ulteriori indagini si renderanno necessarie per valutare l'effettivo grado di protezione

immunitaria fornito dal preparato, qualora i soggetti sottoposti a tale vaccinazione siano esposti ad infezione naturale.

BIBLIOGRAFIA

Afonso A., Gomes S., da Silva J., Marques F. & Henriques M. (2005). Side effects in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) due to intraperitoneal vaccination against vibriosis and pasteurellosis. *Fish Shellfish Immunol.*, 19: 1-16.

Anderson D.P. (1997). Adjuvant and immunostimulants for enhancing vaccine potency in fish. In: *Gudding R., Lillehaug A., Midtlyng P.J., Brown Ed., 90. Karger, Basel: 257-265.*

Austin B. & Austin D.A. (1999). Bacterial Fish Pathogens. Disease of farmed and wild fish. 3rd Edition. *Ed. Springer - Praxis.*

Babelona M.C., Morifiño M.A., Sedano J., Martinez-Manzanares E., Vidaurreta A., Borrigo, J.J. & Toranzo A.E. (1992). Isolation of *Pasteurella piscicida* from sea bass in Southern Spain. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 12: 168-170.

Bogwald J., Stensvag K., Stuge T.B., Jorgensen T. (1994) – Tissue localization and immune responses in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., after oral administration of *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio salmonicida* antigens. *Fish Shellfish Immunol.*, 4: 353-368.

Ceschia G., Quaglio F., Giorgetti G., Bertoja G. & Bovo G. (1991). Serious outbreak of pasteurellosis (*Pasteurella piscicida*) in euryhaline species along the Italian coasts. *Eur. Ass. Fish Pathol., 5th Int. Conf. "Diseases of Fish & Shellfish", Budapest (Hungary): 26.*

Dalmo R.A., Leifson R.M. & Bogwald J. (1995). Microspheres as antigen carriers. Studies on intestinal absorption and tissue localization of polystyrene microspheres in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *J. Fish Dis.*, 18: 87-91.

Dogget T.A. & Harris J.E. (1991). Morphology of the gut associated lymphoid tissue of *Oreochromis mossambicus* and its role in antigen absorption. *Fish Shellfish Immunol.*, 1: 213-227.

Ellis A.E. (1998). Meeting the requirements for delayed release of oral vaccines for fish. *J. Appl. Ichthyol.*, 14: 149-152.

Evensen O. (2003). The vaccine formulation and its role in inflammatory process in fish – effects and adverse effects. In: *3rd Int. Symp. Fish Vaccinology. Norway, Bergen: 23.*

Georgopoulou U. & Vernier J.M. (1986). Local immunological response in the posterior intestinal segment of the rainbow trout after oral administration of macromolecules. *Dev. Comp. Immunol.*, 10: 529-537.

Ghittino C., Latini M., Agnetti F., Panzieri C., Lauro L., Ciappelloni R. & Petracca G. (2003). Emerging pathologies in aquaculture: effects on production and food safety. *Vet. Res. Commun.*, 27, Suppl. 1: 471-479.

Joosten P.H.M., Avilés-Trigueros M., Sorgeloos P. & Rombout J.H.W.M. (1995). Oral vaccination in juvenile carp (*Cyprinus carpio*) and gilthead seabream (*Sparus aurata*) with bioencapsulated *Vibrio anguillarum* bacterin. *Fish Shellfish Immunol.*, 5: 471-485.

Joosten P.H.M., Kruijer W.J. & Rombout J.H.W.M. (1996). Anal immunisation of carp and rainbow trout with different fraction of a *Vibrio anguillarum* bacterin. *Fish Shellfish Immunol.*, 5: 541-551.

- Joosten P.H.M., Tiemersma E., Threels A., Caumartin-Dhieux C. & Rombout J.H.W.M. (1997). Oral vaccination of fish against *Vibrio anguillarum* using alginate microparticles. *Fish Shellfish Immunol.*, 7: 471-485.
- Kawahara E., Kawai K. & Kusuda R. (1989). Invasion of *Pasteurella piscicida* in tissues of experimentally infected yellowtail *Seriola quinqueradiata*. *Nip. Suisan Gakkaishi*, 55: 499-501.
- Kawahara E. & Kusuda R. (1988). Location of *Pasteurella piscicida* antigens in tissues of yellowtail *Seriola quinqueradiata* vaccinated by immersion. *Nip. Suisan Gakkaishi*, 54: 1101-1105.
- Lewis D.H., Grumbles L.C. & Mc Connell S. (1970). Pasteurella-like bacteria from an epizootic in menhaden and mullet in Galveston bay. *J. Wildlife Dis.*, 6, 3: 160-162.
- Magariños B., Toranzo A.E. & Romalde J.L. (1995). Different susceptibility of gilthead seabream and turbot to *Pasteurella piscicida* infection by the water route. *Bull. Eur. Ass. Fish. Pathol.*, 15: 88-90.
- Manganaro M., Ogra P.L. & Ernst P.B. (1994). Oral immunization. turning fantasy into reality. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 103: 223-233.
- Olafsen J.A. & Hansen G.H. (1992). Intact antigen uptake in intestinal epithelial cells of marine fish larvae. *J. Fish Biology*, 40: 141-156.
- Quentel C. & Vigneulle M. (1997). Antigen uptake and immune responses after oral vaccination. *In: Fish Vaccinology. Dev. Biol. Stand. Basel, Karger*, 90: 69-78.
- Roberts R.J. (2001). *Fish Pathology*. 3rd Edition. Ed. W.B. Saunders.
- Romalde J.L. (2002). *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*: an integrated view of a bacterial fish pathogen. *Int. Microbiol.*, 5: 3-9.
- Rombout J.H.W.M., Taverne N., Van de Kamp M. & Taverne-Thiele A.J. (1997). Oral vaccination of fish against *Vibrio anguillarum* using alginate microparticles. *Fish Shellfish Immunol.*, 7: 471-485.
- Rombout J.H.W.M. & Van Berg A.A. (1989). Immunological importance of the second gut segment of carp. I. Uptake and processing of antigens by epithelial cells and macrophages. *J. Fish Biol.*, 35: 13-22.
- Rombout J.H.W.M., Van Berg A.A., Van Berg C.T.G.A., Witte P. & Egberts E. (1989). Immunological importance of the second gut segment of carp. III. Systemic and/or mucosal immune responses after immunization with soluble or particulate antigen. *J. Fish Biol.*, 35: 179-186.
- Smith P.D. (2002). New approaches to the oral administration of vaccines. *In: Atti Workshop: Recent findings of new vaccines against fish pasteurellosis. Udine, 23 Novembre 2002*: 23-25.