

**Valutazione della risposta anticorpale e della protezione indotta da un vaccino per immersione anti *Yersinia ruckeri* in trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*)**

*Evaluation of antibody response and protection conferred by an immersion vaccination against *Yersinia ruckeri* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)*

**Donatella Volpatti<sup>1\*</sup>, Andrea Fabris<sup>2</sup>, Barbara Contessi<sup>1</sup>, Erica Buonasera<sup>1</sup>, Laura Gusmani<sup>1</sup>, Damiano Berton<sup>1</sup>, Marco Galeotti<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Dipartimento di Scienze Animali (DIAN), Facoltà di Medicina Veterinaria - Udine  
<sup>2</sup> Associazione Piscicoltori Italiani - Verona

**RIASSUNTO** – Vaccini costituiti da batteri della specie *Yersinia ruckeri*, inattivati con formalina e somministrabili tramite immersione, sono disponibili in USA e in Europa a partire dalla fine degli anni '70, per la profilassi della bocca rossa o "Enteric Redmouth Disease" (ERM). Nonostante siano state affrontate numerose prove sperimentali per indagare l'esito di questo intervento di profilassi in trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*) risulta ancora poco definita la correlazione fra titoli anticorpali specifici e protezione indotta dal vaccino. L'obiettivo di questa indagine è stato quello di valutare *in vivo* la protezione indotta da un vaccino commerciale somministrato per immersione (30 secondi) a trote iridee di 5 grammi, tramite infezione sperimentale con un ceppo virulento di *Yersinia ruckeri* e di studiare la risposta anticorpale specifica indotta dal medesimo vaccino nelle settimane successive alla somministrazione. Tramite la tecnica di agglutinazione in micropiastra è stato possibile evidenziare la presenza di anticorpi agglutinanti nel siero dei soggetti trattati a partire da 7 settimane dopo la vaccinazione. La tecnica ELISA indiretta ha dimostrato una maggiore sensibilità, evidenziando titoli anticorpali significativamente più elevati rispetto ai controlli, a partire da 5 settimane dopo la vaccinazione. La percentuale relativa di sopravvivenza o RPS, collegata all'efficacia protettiva conferita dal vaccino commerciale, è risultata pari al 77% in seguito a prova di infezione intraperitoneale con  $3 \times 10^6$  UFC/sogg., effettuata a 7 settimane dalla vaccinazione. Tale riscontro consente di ipotizzare che gli anticorpi sierici prodotti in seguito alla immunizzazione tramite immersione siano protettivi nei confronti della malattia.

**SUMMARY** – Immersion vaccines composed of formalin-killed *Yersinia ruckeri* to prevent Enteric Redmouth Disease (ERM), have been commercially available since the end of the 1970s. Until now several researchers were finalised to the evaluation of the post-vaccination response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) but none of them fully clarified the correlation between specific antibodies synthesis and protection. This investigation was finalised to evaluate the protection induced by a commercial vaccine administration in rainbow trouts of 5 g., by an experimental intraperitoneal challenge with a virulent strain of *Yersinia ruckeri*, and to study the specific humoral response developed by the fish throughout the post-vaccination period. Using a microplate-based agglutination assay, it was possible to detect serum agglutinating immunoglobulins starting from 7 weeks after the vaccination. The ELISA technique demonstrated an higher sensitivity, by detecting significant levels of specific antibodies starting from 5 weeks after the vaccination. The relative percentage of survival (RPS), expressing the vaccine effectiveness, was 77% following the experimental challenge based on the intraperitoneal inoculation of  $3 \times 10^6$  UFC/subject, performed 7 weeks after the vaccination. These observations suggest that the specific serum antibodies developed after the immersion vaccination are protective against the disease.

**Key words:** Rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, Enteric Red Mouth Disease, *Yersinia ruckeri*, Vaccination, Humoral immune response.

\* Corresponding Author: c/o Dipartimento di Scienze Animali, Facoltà di Medicina Veterinaria, Via delle Scienze, 208 - 33100 Udine, Italy; Tel.: 0432-558591; Fax: 0432-558585; E-mail: donatella.volpatti@uniud.it.

## INTRODUZIONE

L'enterobatterio Gram negativo *Yersinia ruckeri* è l'agente eziologico della Bocca Rossa, malattia infettiva che induce elevate mortalità e conseguenti perdite economiche nei salmonidi allevati e in particolare nella trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*) e nel salmone atlantico (*Salmo salar*). Il primo riferimento bibliografico in merito alla vaccinazione contro questa malattia risale al 1965 (Ross & Klonz, 1965). In questo studio viene descritta una prova di vaccinazione in trota iridea, che prevedeva la somministrazione orale di cellule batteriche inattivate, in grado di conferire una protezione significativa dall'infezione (RPS=88%). Nel 1976, una formulazione costituita da *Yersinia ruckeri* inattivato (bacterin) fu il primo vaccino per i pesci ad essere registrato e commercializzato negli Stati Uniti. Newman, nel 1993, descrisse l'esito dell'impiego di tale preparazione vaccinale, sottolineandone l'efficacia protettiva indotta impiegando diverse modalità di somministrazione (orale, per iniezione, per immersione). Da allora le cellule batteriche intere appartenenti a ceppi Serovar 1, fissate con formalina, continuano ad essere ampiamente utilizzate nella formulazione dei vaccini per Bocca Rossa. Tale gruppo sierologico è quello maggiormente isolato dagli episodi di malattia in Europa ed è diventato la base della formulazione commerciale bacterin utilizzata nelle trotilture di quest'area. Essa viene in genere somministrata per immersione (30-120 secondi), previa diluizione 1:10.

L'impiego del vaccino per immersione si è dimostrato idoneo in quanto garantisce adeguata protezione degli avannotti, limitando lo stress da manipolazione e da iniezione. Il Bacterin somministrato tramite questa via garantisce ai salmonidi di 1-2 g. protezione per 120-180 giorni, mentre per soggetti di maggiore taglia la protezione sembra protrarsi fino ad un anno (Johnson *et al.*, 1982a; 1982b).

In merito alla risposta immunitaria indotta da questa vaccinazione, vari studi sono stati finalizzati alla valutazione della risposta anticorpale (Johnson *et al.*, 1982a; 1982b; Cipriano & Ruppenthal, 1987; Olesen, 1991) e cellulare (Jones *et al.*, 1993). Una osservazione degna di nota è che nonostante possano garantire protezione dalla malattia, i ceppi Serovar 1 (più utilizzati per produrre il vaccino) inducono una risposta anticorpale e cellulare trascurabile rispetto a quella ottenuta usando i ceppi Serovar 2. Tuttavia, numerose ricerche hanno anche dimostrato che la presenza di anticorpi specifici non garantisce di per sé protezione dalla malattia (Stevenson, 1997). Sulla base delle considerazioni sopra riportate, le problematiche ancora da affrontare in questo settore sono legate alla mancata correlazione fra titoli anticorpali e protezione indotta dal vaccino e alla limitata risposta anticorpale riscontrabile dopo la vaccinazione per immersione. L'obiettivo di questa indagine è stato quello di valutare *in vivo* la protezione indotta dal vaccino commerciale somministrato per immersione a trote iridee di 5 grammi, tramite infezione sperimentale con un ceppo virulento di *Yersinia ruckeri* e di studiare la risposta anticorpale specifica indotta dal medesimo vaccino nelle settimane successive alla somministrazione. I risultati ottenuti saranno utilizzabili per la messa a punto e il perfezionamento dei protocolli di vaccinazione adottati attualmente nelle trotilture.

## MATERIALI E METODI

### Pesci e condizioni di allevamento

Soggetti di trota iridea (*O. mykiss*), di peso medio pari a 5 grammi, sono stati allevati in vasche di cemento (temperatura media dell'acqua 12-13° C) e sono stati alimentati con un mangime commerciale (Biomar) all'1% p.v. I soggetti destinati alla sperimentazione non avevano, precedentemente, subito nessun trattamento profilattico e/o chemioterapico.

### Vaccinazione

La vaccinazione è stata effettuata usando una formulazione commerciale per *Yersinia ruckeri* (Schering Plough). I pesci sono stati trattati mediante immersione per 30 secondi in una sospensione di vaccino diluita in acqua dolce in rapporto 1:9. Al momento del trattamento la temperatura dell'acqua risultava pari a 12° C. Nell'ambito di questa indagine sono stati vaccinati 100.000 avannotti circa. Un gruppo numericamente equivalente di avannotti della stessa taglia non è stato vaccinato ed è stato utilizzato come controllo.

### Prelievo dei sieri

Il sangue è stato prelevato dai soggetti di controllo (pre-vaccinazione) e dai soggetti vaccinati a 2, 3, 5 e 7 settimane dalla vaccinazione (da 60 a 150 soggetti/prelievo), previa sedazione con 40 ppm di tricaina metansulfonato (MS222). I sieri ottenuti mediante centrifugazione a 2000 xg per 10 minuti, sono stati riuniti in pool (costituiti da 4 sieri ciascuno) e conservati a - 80° C fino al momento della valutazione.

### Saggio di agglutinazione per la valutazione della risposta anticorpale specifica

Cellule batteriche di *Y. ruckeri*, ottenute da brodocoltura, sono state lavate con PBS e la densità ottica (D.O. <sub>620nm</sub>) della sospensione è stata portata a 1 ( $1 \times 10^9$  cellule/ml) mediante spettrofotometro. I campioni (pool) di siero da analizzare sono stati diluiti 1:10 in tampone PBS con formalina allo 0,3%. Cinquanta µl/pozzetto di ciascun campione sono stati depositati nella prima colonna di una piastra standard per agglutinazione (96 pozzetti con fondo ad "U"). I campioni sono stati sottoposti a diluizioni seriate partendo dalla diluizione 1:10 per arrivare alla diluizione massima di 1:2000. Successivamente sono stati aggiunti 25 µl/pozzetto della sospensione batterica, incubando la piastra a temperatura ambiente per 5 minuti e overnight a 4° C. L'agglutinazione è stata osservata mediante riscontro di un caratteristico sedimento sul fondo dei pozzetti e successiva classificazione dello stesso in base ad un criterio oggettivo riportato nella bibliografia di riferimento (Robertson, 1990):

- assenza agglutinazione = ridotto sedimento lattescente;
- inizio agglutinazione = ridotto sedimento lattescente con inizio di alone opalescente;
- completa agglutinazione = esteso sedimento opalescente.

### Saggio ELISA per la valutazione della risposta anticorpale specifica

L'ELISA per la titolazione degli anticorpi anti *Y. ruckeri* è stata realizzata seguendo una metodica descritta da Bakopoulos *et al.* (1997), modificata per quanto riguarda il sistema di rivelazione. La micropiastra da 96 pozzetti è stata rivestita con 100 µl/pozzetto di poli L-lisina 0,001% (Sigma) in tampone bicarbonato 0,1 M a pH 9,6 ed incubata per 1 h a temperatura ambiente. Dopo 3 lavaggi con LSBW (low salt wash buffer), la piastra è stata rivestita con 100 µl/pozzetto di *Y. ruckeri* (cellule intere lavate con PBS, D.O.<sub>620 nm</sub>=1), ed incubata per 1 h a temperatura ambiente. I batteri sono stati fissati aggiungendo 50µl/pozzetto di glutaraldeide allo 0,05% in PBS, incubando per 20 min a temperatura ambiente. Dopo 3 lavaggi con LSBW, è stato effettuato un blocco dei siti aspecifici aggiungendo 100 µl/pozzetto di siero albumina bovina al 2% in PBS (incubazione overnight a 4° C). Dopo 3 lavaggi con HSWB (high salt wash buffer), sono stati aggiunti (100µl/pozzetto) i sieri da saggiare, diluiti da 1:10 a 1:200 in PBS con 0,1% Tween 20, incubati per 1 h a temperatura ambiente. In alcuni pozzetti, che costituiscono il bianco, è stata omessa l'aggiunta del siero. Dopo 5 lavaggi con HSWB, 100 µl/pozzetto di anticorpo monoclonale anti Ig di trota diluito 1:33 in PBS con 0,1% di Tween 20 (Aquatic Diagnostic, F11, UK), sono stati aggiunti ed incubati per 1 h a temperatura ambiente. Dopo 5 lavaggi con HSWB, ai pozzetti (100 µl) è stato aggiunto un anticorpo policlonale biotilato anti Ig di

topo (DAKO) diluito 1:2000 in PBS con 0,1% di Tween 20, incubato a 37° C per 1 h. Come sistema rilevatore è stato impiegato un kit streptavidina-fosfatasi alcalina (Sigma) diluito 1:2000 in PBS con 0,1% Tween 20, incubato per 1 h a 37° C (100 µl/pozzetto). Il substrato utilizzato era pNPP (Sigma) alla concentrazione di 1 mg/ml in tampone glicina 0,1 M pH 10,4. La lettura della micropiastra è stata effettuata con multispettofotometro Tecan a 405 nm. Come controllo positivo è stato utilizzato un pool di sieri immuni ottenuti immunizzando con *Y. ruckeri* inattivati con formalina (iniezione intraperitoneale) trote iridee adulte. I dati ottenuti sono stati statisticamente elaborati mediante test T di Student ( $p \leq 0,05$ ).

#### Infezione sperimentale (challenge)

Un ceppo batterico isolato da trota iridea, con profilo biochimico 5107100 (API 20E), ossidasi negativo, catalasi positivo, corrispondente a quanto descritto in bibliografia per *Y. ruckeri* (Austin & Austin, 1999; Austin *et al.*, 2003) è stato rivirulentato mediante due passaggi *in vivo* secondo il metodo suggerito dal Dr. Colorni (comunicazione personale), quindi conservato in aliquote a -80° C. In breve, tale procedura consisteva nell'inoculare i batteri lavati e risospesi in PBS, tramite iniezione intraperitoneale, in trota iridea, e nel reisolare gli stessi da un omogenato di fegato o milza del medesimo soggetto, mediante centrifugazione. Tali batteri venivano inoculati nuovamente in trota iridea. In questo modo si evitava il passaggio culturale in medium solido, con eventuale riduzione della virulenza del ceppo utilizzato.

I batteri utilizzati per l'infezione sono stati coltivati in TSB a 24° C fino al raggiungimento della fase logaritmica di crescita, quindi lavati mediante centrifugazione a 2000 xg per 45 minuti e risospesi in PBS. La concentrazione batterica è stata determinata mediante stima spettrofotometrica della densità ottica a 620 nm, quindi il numero effettivo di UFC/ml contenute nelle sospensioni inoculate è stato confermato mediante conta su terreno solido. La DL<sub>70</sub> (dose letale 70) è stata determinata nel corso di una prova preliminare che ha previsto l'inoculo intraperitoneale di 2 dosi batteriche a due gruppi di trote iridea ospitati in acquario.

Per realizzare il challenge, soggetti vaccinati e di controllo sono stati trasferiti dall'allevamento alla cabina di infezione del DIAN, ospitata presso il Laboratorio di Biologia Marina di Trieste. Il trasferimento è stato condotto utilizzando un veicolo adeguatamente allestito con vasche in vetroresina e bombola per l'ossigenazione dell'acqua. I pesci sono stati stabulati in vasche di vetroresina (140 l), inserite un impianto a ciclo aperto approvvigionato con acqua di fonte, filtrata con carbone attivo (T = 18° C, ricambio 2 l/min). Nella fase di acclimatazione i pesci sono stati alimentati con mangime commerciale (1% del p.v.). Il tempo intercorso dal termine della vaccinazione all'infezione è stato pari a 7 settimane. Il challenge è stato attuato, previa anestesia di tutti i soggetti mediante benzocaina (0,03 g/l), secondo lo schema riportato nella Tabella 1.

La mortalità è stata registrata per 10 giorni (Nordmo, 1997), quindi espressa come mortalità cumulativa e come percentuale relativa di sopravvivenza, come proposto da Amend (1981):

$$RPS = [1 - (\% \text{ mortality in vaccinated group } / \% \text{ mortality in control group})] \times 100.$$

I risultati sono stati analizzati statisticamente mediante test  $\chi^2$  ( $p \leq 0,01$ ). I soggetti morti in seguito all'infezione, sia di controllo che vaccinati, sono stati sottoposti ad esame batteriologico e a necropsia, per confermare la diagnosi di Bocca Rossa.

Gruppo	Numero di soggetti	Infezione – Dose batterica utilizzata
A – controllo	67	i.p. – $3 \times 10^7$ UFC/soggetto (50 $\mu$ l)
B – controllo	67	i.p. – $3 \times 10^6$ UFC/soggetto (50 $\mu$ l)
C – controllo	67	i.p. - PBS (50 $\mu$ l)
D – vaccinati	80	i.p. – $3 \times 10^7$ UFC/soggetto (50 $\mu$ l)
E – vaccinati	80	i.p. – $3 \times 10^6$ UFC/soggetto (50 $\mu$ l)
F – vaccinati	81	i.p. - PBS (50 $\mu$ l)

Tabella 1 - Schema di infezione sperimentale adottato per valutare la protezione conferita dal vaccino anti *Yersinia ruckeri*.

Table 1 - Design of experimental infection adopted to evaluate the vaccine effectiveness against *Yersinia ruckeri*.

## RISULTATI

### Saggio di agglutinazione per la valutazione della risposta anticorpale specifica

I sieri prelevati a 2, 3 e 5 settimane post-vaccinazione hanno dato risultati negativi, ovvero non è stata riscontrata agglutinazione entro la diluizione 1:320.

Diversamente, l'81% dei sieri prelevati a 7 settimane dalla vaccinazione è risultato positivo al test di agglutinazione (Figura 1, freccia). Nel 24% dei sieri positivi, l'agglutinazione è presente fino alla diluizione di 1:320.

### Saggio ELISA per la valutazione della risposta anticorpale specifica

La risposta anticorpale specifica è stata misurata utilizzando un sistema ELISA indiretto, contro batteri *Yersinia ruckeri*. Per ogni prelievo effettuato (pre-vaccinazione, 2, 3, 5 e 7 settimane) sono stati analizzati 15 pool di sieri, considerando come diluizione ottimale quella 1:50 e come lettura spettrofotometrica (D.O.= 405 nm) quella effettuata a 30 minuti. I risultati sono riportati nella Figura 1. A titolo comparativo è stato analizzato, come controllo positivo, un pool di sieri iper-immuni ottenuti da trota iridea, che hanno fornito una lettura spettrofotometrica pari a 0,58 (Figura 1, colonna in nero). I sieri prelevati in fase di pre-vaccinazione, a 2 e 3 settimane post-vaccinazione sono risultati negativi (D.O. < 0,2). La presenza di una risposta anticorpale specifica significativamente più alta rispetto ai prelievi precedenti è stata evidente sia a 5 che a 7 settimane post-vaccinazione (D.O. = 0,47 e 0,34, rispettivamente). È stata comunque riscontrata una notevole variabilità individuale nella risposta anticorpale, indipendentemente dal prelievo effettuato, come suggerito dalle deviazioni standard calcolate.

### Infezione sperimentale (challenge)

In base alla valutazione preliminare della DL<sub>70</sub> sono state scelte due dosi batteriche per saggiare, mediante infezione sperimentale, la protezione indotta dal vaccino, rispettivamente  $3 \times 10^7$  UFC/soggetto e  $3 \times 10^6$  UFC/soggetto. In tutti i soggetti morti in seguito al challenge, l'esito dell'esame batteriologico è stato positivo per *Y. ruckeri*, tranne nei pesci di controllo (gruppi C ed F) ai quali era stata iniettata una soluzione fisiologica sterile (PBS). L'esame anatomopatologico, in tutti i casi risultati positivi, ha evidenziato iperpigmentazione cutanea,

esoftalmo bilaterale, anemia branchiale e una forte enterite catarrale, che si manifestava in vasca con la presenza di numerosi agglomerati di feci e muco intestinale (c.d. pseudocasts).

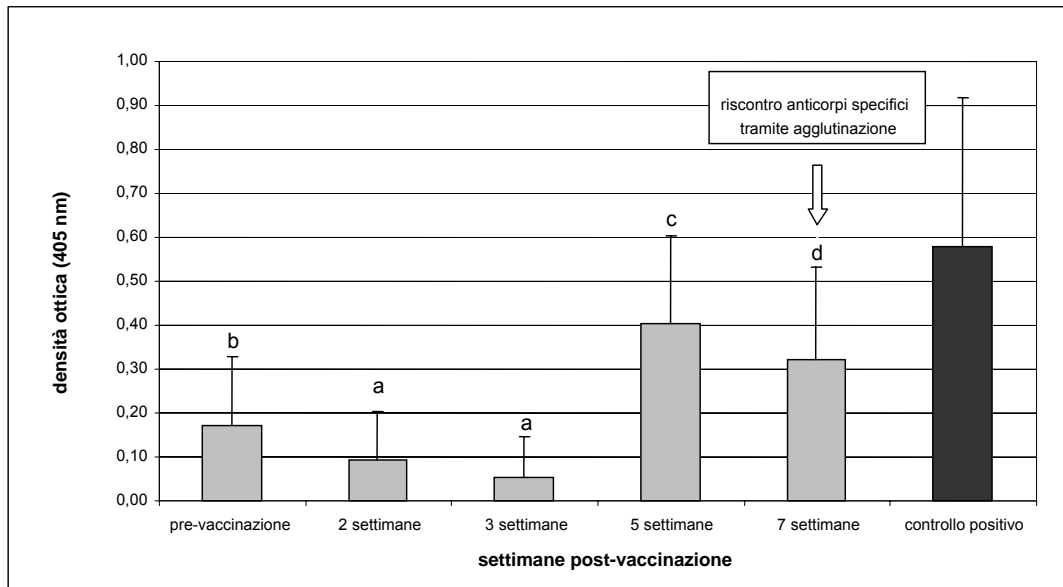


Figura 1 - Risposta anticorpale specifica contro *Yersinia ruckeri* in soggetti sottoposti a vaccinazione tramite immersione. Saggio ELISA in sieri prelevati prima della vaccinazione e 2, 3, 5, 7 settimane dopo la vaccinazione. La colonna in nero indica il siero iper-immune. Le barre verticali indicano la deviazione standard, (a, b, c, d) le differenze significative ( $p \leq 0,05$ ). Test T di Student.

Figure 1 - Specific antibody responses against *Yersinia ruckeri* in subjects submitted to immersion vaccination. ELISA on sera collected prior to the vaccination and 2, 3, 5, 7 weeks post-vaccination. The black column indicates the iper-immune sera. Vertical bars indicate standard deviations, (a, b, c, d) significant differences ( $p \leq 0.05$ ). Student T test.

L'esito delle prove di protezione, espresso come mortalità percentuale e come percentuale relativa di sopravvivenza, è riassunto nella Tabella 2, mentre la mortalità cumulativa è schematizzata nelle Figure 2 e 3. La mortalità percentuale nei gruppi vaccinato e di controllo inoculati con PBS è risultata trascurabile (2,5 e 4,5%). La mortalità percentuale nei gruppi vaccinati e di controllo sottoposti a challenge con la dose batterica più alta è risultata pari a 42,5 e 62,7%, rispettivamente. La mortalità percentuale nei gruppi vaccinati e di controllo sottoposti a challenge con la dose batterica più bassa è risultata pari a 11,25 e 49,3%, rispettivamente. L'elaborazione statistica, finalizzata a confrontare la mortalità percentuale dei gruppi infettati con la stessa dose, vaccinati e non, ha evidenziato che le differenze fra i valori ottenuti sono significative per  $P \leq 0,01$  ( $\chi^2 = 90,47$ ). Il vaccino per immersione ha garantito, rispetto ai controlli non vaccinati, una RPS pari a 32% nel caso del challenge effettuato con la dose infettante più alta ( $3 \times 10^7$  UFC/sogg.) e pari al 77% nel caso del challenge effettuato con la dose infettante più bassa ( $3 \times 10^6$  UFC/sogg.).

Giorni post-infezione	Challenge					
	Soggetti vaccinati			Soggetti di controllo		
	gruppo D $3 \times 10^7$ UFC/sogg	gruppo E $3 \times 10^6$ UFC/sogg	gruppo F PBS	gruppo A $3 \times 10^7$ UFC/sogg	gruppo B $3 \times 10^6$ UFC/sogg	gruppo C PBS
	<b>Mortalità</b>					
1	0	0	0	0	0	0
2	10	0	0	20	0	0
3	8	1	0	10	3	0
4	6	3	0	4	5	0
5	9	3	1	3	9	1
6	0	0	0	3	12	0
7	1	2	1	2	4	2
8	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0
<b>mortalità %</b>	<b>42,5%<sup>a</sup></b>	<b>11,25%<sup>c</sup></b>	<b>2,5%</b>	<b>62,7%<sup>b</sup></b>	<b>49,3%<sup>b</sup></b>	<b>4,5%</b>
<b>RPS</b>	<b>32%</b>	<b>77%</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>

Tabella 2 - Mortalità osservata nei pesci vaccinati e di controllo, in seguito a challenge intra-peritoneale con due dosi infettanti di *Yersinia ruckeri*. I valori di RPS esprimono la protezione conferita dal vaccino ( $P \leq 0,01$ , test  $\chi^2$ ).  
 Table 2 - Mortalities observed in vaccinated and control fish, after the intra-peritoneal challenge with two doses of *Yersinia ruckeri*. RPS values indicate the protection conferred by the vaccine ( $P \leq 0,01$ ,  $\chi^2$  test).

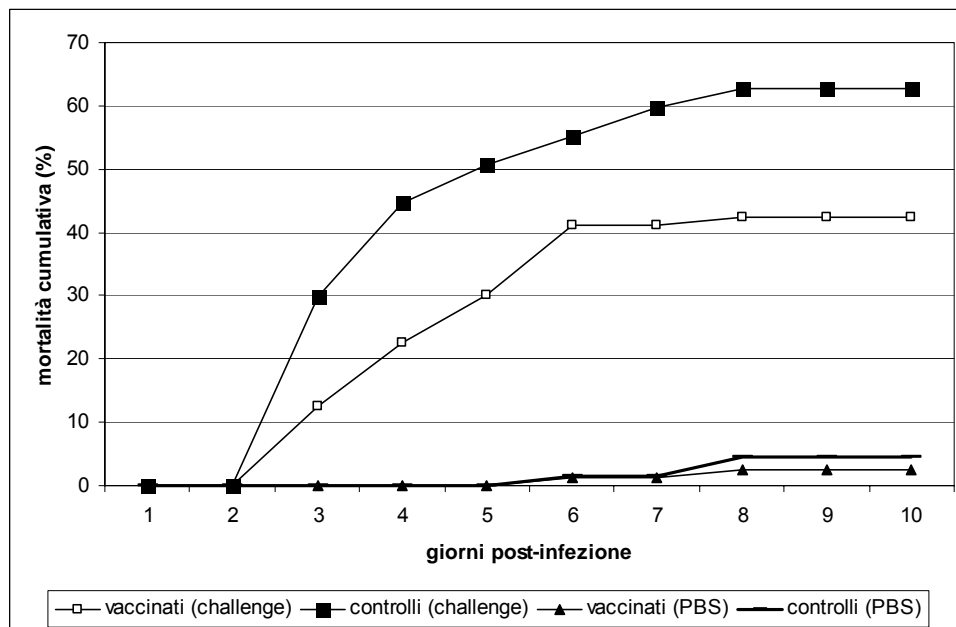


Figura 2 - Mortalità cumulativa registrata nei soggetti vaccinati e di controllo, dopo infezione sperimentale con *Yersinia ruckeri* (challenge i.p.,  $3 \times 10^7$  ufc/ml).  
 Figure 2 - Cumulative mortality in control and vaccinated subjects, experimentally infected with *Yersinia ruckeri* (i.p. challenge,  $3 \times 10^7$ /ml).

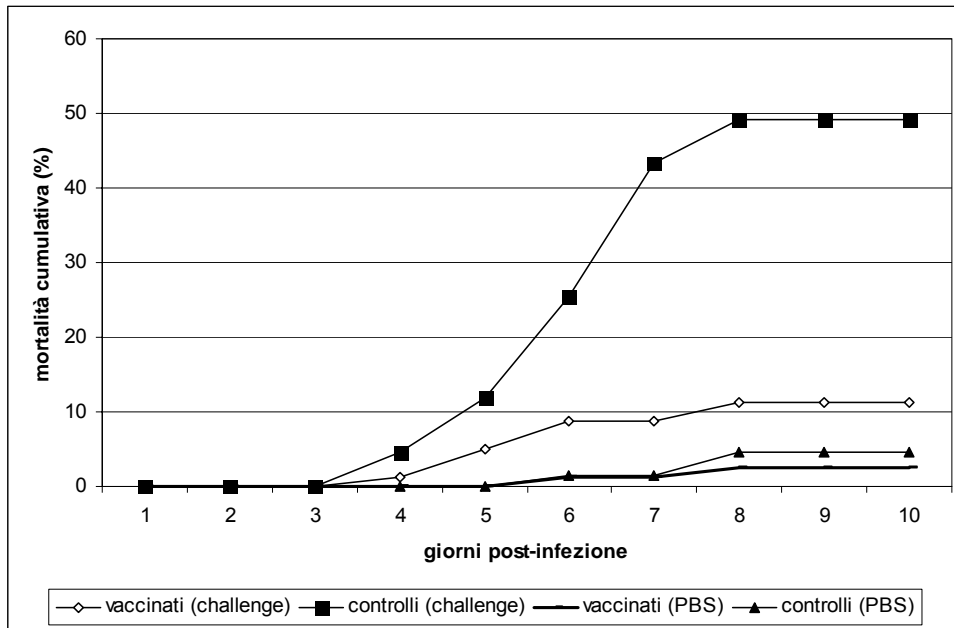


Figura 3 - Mortalità cumulativa registrata nei soggetti vaccinati e di controllo, dopo infezione sperimentale con *Yersinia ruckeri* (challenge i.p.,  $3 \times 10^6$  ufc/ml).

Figure 3 - Cumulative mortality in control and vaccinated subjects, experimentally infected with *Yersinia ruckeri* (i.p. challenge,  $3 \times 10^6$  ufc/ml).

## DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

In molte prove di vaccinazione tramite immersione, gli anticorpi contro i patogeni sono scarsamente evidenziabili nel siero tramite sistemi di microtitolazione, o sono presenti in dosi molto limitate. Inoltre, quando presenti, non sono sempre correlabili con la protezione dalla malattia. In contrasto con queste affermazioni, alcuni autori hanno riscontrato un alto livello di anticorpi specifici nel siero di pesci vaccinati tramite immersione (Nakanishi & Ototake, 1997). Pertanto il ruolo della risposta umorale specifica nei meccanismi di protezione dopo la vaccinazione per immersione è piuttosto controverso. La prova sperimentale oggetto di questa trattazione ha contemplato entrambi questi aspetti in trote iridee sottoposte ad una vaccinazione anti Bocca Rossa.

La prova di infezione condotta su soggetti di 5 grammi, realizzata a 7 settimane dalla somministrazione del vaccino commerciale (immersione per 30 secondi) ha indotto mortalità significativamente differenti tra i pesci vaccinati e quelli non vaccinati (controlli) utilizzando entrambe le dosi batteriche infettanti ( $3 \times 10^7$  UFC/sogg. e  $3 \times 10^6$  UFC/sogg.).

Nei gruppi di controllo (A e B) le due dosi batteriche hanno determinato percentuali di mortalità significativamente differenti (62,7% *versus* 49,3%), tuttavia l'evoluzione della mortalità in tali gruppi risultava diversa. Nel gruppo A, il picco di mortalità si è verificato intorno al 2°-3° giorno post-infezione mentre nel gruppo B la mortalità è andata progressivamente aumentando fino al 6° giorno. È opinione degli autori che l'infezione con

la dose più bassa abbia simulato meglio il decorso che la malattia spontanea manifesta in allevamento.

In tutti i soggetti morti nella fase di monitoraggio del challenge, l'esito dell'esame batteriologico è stato positivo per *Y. ruckeri*, tranne che nei gruppi di controllo (C ed F) in cui è stata iniettata una soluzione tampone sterile; in questi casi la mortalità è probabilmente da ascrivere agli effetti collaterali dell'iniezione intraperitoneale.

L'esame anatomopatologico, in tutti i casi risultati positivi, ha evidenziato iperpigmentazione cutanea, esoftalmo bilaterale, anemia branchiale e una forte enterite catarrale (non emorragica) che si manifestava in vasca con la presenza di numerosi agglomerati di feci e muco intestinale (c.d. pseudocasts). Questi sintomi non sono immediatamente riconducibili ad infezione da *Y. ruckeri*, che in condizioni di allevamento si presenta con tipiche lesioni emorragiche attorno alla rima buccale, agli occhi e con una forte enterite emorragica. L'anomalia del quadro osservato è probabilmente da ascrivere alla via di infezione intraperitoneale, non spontanea, che ha determinato l'instaurarsi di una infezione ad andamento iperacuto, senza la manifestazione dei segni classici di malattia.

Sulla base delle osservazioni condotte e delle informazioni disponibili in letteratura, è possibile affermare che tra le due dosi batteriche somministrate, solo una risulta idonea alla stima della percentuale relativa di sopravvivenza. Come riportato dalla farmacopea europea (2001) una prova di protezione, per essere considerata attendibile, deve consentire il raggiungimento del 60% di mortalità specifica nel gruppo di controllo (non vaccinato). Nella nostra esperienza ciò è avvenuto con la dose infettante pari a  $3 \times 10^7$  UFC/sogg., che ha determinato una mortalità del 62,7% nei controlli. La RPS calcolata nel gruppo D, vaccinato e sottoposto ad infezione utilizzando questo modello di challenge, è risultata pari al 32%. Tale percentuale, anche se più bassa rispetto al valore di riferimento suggerito dalla letteratura (RPS=60%) per confermare l'efficacia dei vaccini somministrati per immersione, fa ipotizzare che la formulazione somministrata sperimentalmente conferisce protezione a soggetti di taglia pari a 5 grammi.

Per quanto riguarda la valutazione delle risposta anticorpale specifica indotta dal trattamento di vaccinazione, le prove di agglutinazione hanno dato esito positivo (agglutinazione entro la diluizione sierica 1:320) solo nel campionamento di sieri effettuato alla 7<sup>a</sup> settimana post-vaccinazione, nell'81% dei campioni. Tale campionamento era stato eseguito in concomitanza con il challenge. Questo dato potrebbe suggerire l'instaurarsi di una immunità specifica sufficiente per la protezione circa due mesi dopo la vaccinazione. Questo dato è stato suffragato da un saggio maggiormente sensibile per valutare il titolo anticorpale specifico, come la tecnica ELISA, già proposta da Olesen (1991) nell'ambito di una prova di vaccinazione per Bocca Rossa effettuata in trote iridea di taglia superiore a quella da noi contemplata, ossia 25 g. Le prove ELISA descritte in letteratura hanno evidenziato una risposta anticorpale significativa nel caso di trote iridea vaccinate tramite iniezione intraperitoneale con *Y. ruckeri* inattivato, mentre la stessa tecnica non è stata in grado di evidenziare anticorpi specifici in soggetti vaccinati tramite immersione per 30 secondi. Solo Anderson *et al.* (1979) avevano descritto la presenza di anticorpi anti *Y. ruckeri* nel siero di trote immerse per 2 minuti in antigene O del batterio, tramite un sistema di emoagglutinazione passiva con eritrociti di pecora.

Nella presente ricerca il saggio ELISA ha consentito di evidenziare, in trote iridea di 5 g., una risposta anticorpale specifica per tale patogeno a partire da 5 settimane dopo la vaccinazione e il mantenimento della stessa fino a 7 settimane. Tale riscontro consente di affermare la maggiore sensibilità del saggio ELISA rispetto all'agglutinazione nella stima del titolo anticorpale specifico nel siero. Inoltre, i risultati ottenuti confermano la possibilità di sintesi di anticorpi specifici anche in soggetti sottoposti ad una immersione breve (30 secondi) nella sospensione vaccinale anti *Yersinia ruckeri*. L'esito delle prove di infezione

sperimentali condotte conferma inoltre che tali anticorpi risultano protettivi nei confronti della malattia, almeno fino a 7 settimane dal trattamento di profilassi. Per concludere si pongono alcuni spunti di riflessione che potrebbero essere utili per il proseguimento dello studio. A nostro avviso potrebbe essere interessante valutare la risposta anticorpale specifica e la protezione nei confronti di una infezione sperimentale, anche in momenti successivi al presente, per disporre di dati sulla durata nel tempo della protezione. Potrebbe, inoltre, essere interessante valutare l'effetto "booster" di un successivo trattamento vaccinale, anche attraverso la somministrazione orale confrontando gli eventuali dati di protezione con quelli già ottenuti nella presente ricerca.

## RINGRAZIAMENTI

La presente ricerca è stata finanziata dalla regione Friuli Venezia Giulia (L.R. 164/98). Gli autori desiderano ringraziare il Dr. Giavenni, veterinario libero professionista e il Sig. Martincig, DIAN, Università di Udine, per il contributo nel corso delle prove sperimentali.

## BIBLIOGRAFIA

- Amend D.F. (1981). Potency testing of fish vaccines. *International symposium on Fish Biologics: Serodiagnosis and Vaccines. Develop. Biol. Standard.*, 49: 447-454.
- Anderson D.P., Robertson B.S. & Dixon O.W. (1979). Plaque-forming cells and humoral antibody in rainbow trout (*S. gairdneri*) induced by immersion in a *Y. ruckeri* O-antigen preparation. *J. Fish Res. Bd. Can.*, 36, 6: 636-639.
- Austin B. & Austin D.A. (1999). Bacterial fish pathogens. Disease of farmed and wild fish. *Springer-Praxis*.
- Austin D.A., Robertson P.A.W. & Austin B. (2003). Recovery of a new biogroup of *Yersinia ruckeri* from diseased rainbow trout (*O. mykiss*, Walbaum). *System. Appl. Microbiol.*, 26: 127-131.
- Bakopoulos V., Volpatti D., Adams A., Galeotti M. & Richards R. (1997). Qualitative differences in the immune response of rabbit, mouse and sea bass, *D. labrax*, to *P. damsela* subsp. *piscicida*, the causative agent of fish Pasteurellosis. *Fish Shellfish Immunol.*, 7: 161-174.
- Cipriano R.C. & Ruppenthal T. (1987). Immunization of salmonids against *Yersinia ruckeri*: significance of humoral immunity and cross protection between serotypes. *J. Wildlife Dis.*, 23: 545-550.
- European Pharmacopoeia (2001). Vibriosis vaccine (inactivated) for salmonids. Supplement 2001, 1585-1586.
- Johnson K.A., Flynn J.K. & Amend D.F. (1982a). Onset of immunity in salmonid fry vaccinated by direct immersion in *Vibrio anguillarum* and *Yersinia ruckeri* bacterins. *J. Fish Dis.*, 5: 197-205.
- Johnson K.A., Flynn J.K. & Amend D.F. (1982b). Duration of immunity in salmonids vaccinated by direct immersion in *Vibrio anguillarum* and *Yersinia ruckeri* bacterins. *J. Fish Dis.*, 5: 207-213.
- Jones S.R.M., Stevenson R.M.W. & Paterson W.D. (1993). Proliferation of rainbow trout (*O. mykiss*) lymphocytes in response to the bacterial pathogen *Yersinia ruckeri*. *Bull. Aquaculture Association Can.*, 4: 93-95.

- Nakanishi T. & Ototake M. (1997). Antigen uptake and immune responses after immersion vaccination. *In: Fish vaccinology. Gudding, Lillehaugh, Midtlyng, Brown eds. Dev. Biol. Stand. Basel, Karger*, vol. 90: 59-68.
- Newman S.G. (1993). Bacterial vaccines for fish. *Ann. Rev. Fish Dis.*, 3: 145-185.
- Nordmo R. (1997). Strengths and weakness of different challenge methods. *In: Fish vaccinology. Gudding, Lillehaugh, Midtlyng, Brown eds. Dev. Biol. Stand. Basel, Karger*, vol. 90: 303-309.
- Olesen N.J. (1991). Detection of the antibody response in rainbow trout following immersion vaccination with *Yersinia ruckeri* bacterins by ELISA and passive immunization. *J. Appl. Ichthyology*, 7: 36-43.
- Robertson B.S. (1990). Bacterial agglutination. *In: Techniques in fish immunology. Eds. Stolen J.S., Anderson D.P., Robertson B.S., van Muiswinkel W.B. SOS Publications, USA*: 81-86.
- Ross A.J. & Klontz G.W. (1965). Oral immunization of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) against an etiological agent of "Redmouth Disease". *J. Fish Res. Bd. Can.*, 22: 713-719.
- Stevenson R.M.W. (1997). Immunization with bacterial antigens: Yersiniosis. *In: Fish vaccinology. Gudding, Lillehaugh, Midtlyng, Brown eds. Dev. Biol. Stand. Basel, Karger*, vol. 90: 117-124.