

**Utilizzo di vaccini con adjuvante oleoso  
nei confronti della lattococcosi (*Lactococcus garvieae*)  
della trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*)**

*Use of oil adjuvanted vaccines against lactococcosis  
(Lactococcus garvieae) in rainbow trout  
(Oncorhynchus mykiss)*

**Amedeo Manfrin<sup>1\*</sup>, Luca Fasolato<sup>1</sup>, Mirco Volpin<sup>1</sup>, Fabio Borghesan<sup>1</sup>,  
Marina Rosteghin<sup>1</sup>, Erica Rampazzo<sup>1</sup>, Andrea Fabris<sup>2</sup>,  
Giuseppe Bovo<sup>1</sup>, Katia Qualtieri<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie – Legnaro (PD).

<sup>2</sup> Associazione Piscicoltori Italiani – Verona.

---

**RIASSUNTO** - Negli ultimi anni la lattococcosi, causata da *Lactococcus garvieae*, è stata la principale malattia batterica che ha interessato la trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*) in Italia, in particolare durante le fasi di ingrasso. *L. garvieae* è particolarmente virulento e può causare mortalità del 30-50% dei soggetti al termine del ciclo produttivo, causando seri danni economici agli allevatori. Contrariamente alla terapia antibiotica, sempre meno efficace, la vaccinazione è l'unica opportunità per controllare tale malattia. I triticoltori sono soliti usare vaccini stabulogeni, costituiti da cellule batteriche inattivate con la formalina, inocolandoli per via intraperitoneale, ma la durata della protezione non supera i tre mesi. Nel 2004 abbiamo testato differenti vaccini in emulsione oleosa ( $10^9$  ufc/ml di bacterin più adjuvante minerale e non minerale) per via i.p. sia sperimentalmente sia in prove di campo (50.000 trote iridee appartenenti a due tritocolture endemicamente infette con *L. garvieae*). Per sei mesi sono state registrate la Mortalità Cumulativa e la Relative Per cent Survival (RPS). Nessun pesce è morto o ha evidenziato importanti effetti collaterali a seguito dell'inoculazione i.p. L'utilizzo dell'adjuvante non minerale (ISA 763 AVG<sup>®</sup>) ha garantito una protezione per circa 6 mesi, un'alta RPS (74,5% nell'allevamento A e maggiore del 78% nell'allevamento B) e buone performances produttive.

**SUMMARY** - Since now lactococcosis, caused by *Lactococcus garvieae*, has been the main bacterial disease in Italy affecting rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), mainly during fattening. *L. garvieae* is particularly virulent, and mortality may reach 30-50% in subjects at the end of the productive cycle, with serious economic repercussions on farmers. Despite of antibiotic therapy, day by day less efficient, vaccination is the only opportunity to control this bacterial disease. Formalin Killed autovaccines (bacterin) are used by trout farmers via i.p. injection, but the duration of protection is no more longer then 3 months. In 2004 we tested different water in oil (W/O) adjuvanted vaccines ( $10^9$  ufc/ml of bacterin with mineral or non mineral oil) by i.p. injection both in experimental trial than field trials (50.000 rainbow trouts, belonging to two trout farmings endemically infected with *L. garvieae*). Cumulative mortality and Relative Per cent Survival (RPS) for a period of 6 months were evaluated. No fish had abnormal mortalities or important side effects as a consequence of i.p. injection. The use of non mineral oil adjuvant (ISA 763 AVG<sup>®</sup>) results in long protection (6 months), high per cent of survival (74.5% in farm A and more than 78% in farm B) and good production performances.

**Key words:** Lactococcosis, *Lactococcus garvieae*, Rainbow trout, Oil adjuvanted vaccines.

---

\* Corresponding Author: c/o Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Via Leonardo da Vinci 39 – 45011 Adria (RO). Tel.: 0426-21841; Fax: 0426-901411; E-mail: manfrin@izsvenezie.it

## INTRODUZIONE

La lattococcosi nei pesci è una malattia a diffusione cosmopolita, che colpisce varie specie d'allevamento, sia d'acqua dolce che marina. Rappresenta al momento attuale la patologia batterica più grave della trotilcoltura italiana. Da alcuni anni imperversa, soprattutto nei mesi estivi, producendo danni economici ingenti, per il fatto che ne sono colpiti soprattutto i soggetti adulti pronti ad essere commercializzati. E' molto probabilmente una delle principali cause della diminuzione della produzione nazionale di questa specie ittica (Ghittino *et al.*, 2002), passata dalle 50.000 t del 1995 alle 39.500 t del 2005 (dati API). Pur essendo oggi un problema soprattutto dell'allevamento delle trote, *Lactococcus garvieae* colpisce anche altre specie, non solo di acqua dolce. I primi isolamenti documentati si sono avuti in Giappone: sono stati riscontrati nelle trote iridee (*Oncorhynchus mykiss*) di allevamento già nel lontano 1958. Negli anni settanta la malattia si è diffusa in molti allevamenti nipponici di pesce marino: grossi problemi si sono avuti nell'allevamento dell'anguilla (*Anguilla japonica*) nel 1973 (Kusuda & Komatsu, 1978) e nell'allevamento della ricciola (*Seriola quinqueradiata*) (Kusuda *et al.*, 1976) dove nei periodi estivi riesce a dare ingenti perdite (8.000 t nei primi anni novanta) diventando una delle più importanti malattie della maricoltura giapponese. Nel 1974 altre segnalazioni si sono avute in Sud Africa: qualificato come *Enterococcus* sp. in allevamento di trota iridea nella regione del Transvaal (Boomker *et al.*, 1979). Riscontri negli allevamenti di tilapia (*Oreochromis* sp.) e di ayu (*Plecoglossus altivelis altivelis*) sono stati descritti da Kitao nel 1981 (Austin & Austin, 1999). In Asia si sono avuti altri recenti riscontri a Taiwan in trote iridee (Chang *et al.*, 2002) ed un focolaio in cefali (Chen *et al.*, 2002). In Australia (Stato di Victoria) e Tasmania i primi riscontri si hanno nel 1987 in allevamenti di trota iridea come *Enterococcus*-like (Carson *et al.*, 1993). E' stato rilevato anche in *Trachurus japonicus*, rombo giapponese (*Paralichthys olivaceus*), red sea bream (*Pagrus major*) (Kusuda & Salati, 1993). Sono riportati riscontri nel salmone coho (*O. kisutch*) e nel *Sebastes schlegelii* (Sakai *et al.*, 1987). Tra i salmonidi il salmone atlantico (*Salmo salar*) pare essere più resistente della trota iridea, così pure la trota fario (*Salmo trutta fario*) (Munday *et al.*, 1993). In Europa la prima comparsa documentata risale ai riscontri di Palacios nel 1988 (Palacios *et al.*, 1993) in allevamenti di trote iridee in Spagna. Ultimamente si è riscontrato con sempre maggiore frequenza anche sul territorio francese. Negli ultimi anni sono stati isolati casi in Inghilterra, Austria e Turchia (Diler *et al.*, 2002). Non si conoscono allo stato attuale le situazioni epidemiologiche negli altri stati membri della Comunità Europea (Prearo, 2002). In Italia la malattia ha fatto la sua comparsa nel 1991 (Ceschia *et al.*, 1992; Ghittino & Prearo, 1992) e in poco tempo sono stati numerosi gli isolamenti da trotilcolture soprattutto dell'Italia settentrionale (Ghittino *et al.*, 2002). Oggi, inoltre, è possibile riscontrarla anche in impianti montani, dove fino a qualche tempo fa risultava assente, nei quali causa danni decisamente meno gravi rispetto a quelli sopportati dalle aziende di pianura. Negli ultimi anni, sia il peggioramento delle condizioni ambientali (minor apporto idrico negli impianti ed aumento della temperatura per periodi prolungati - global warming), sia l'aggravamento della patologia (il germe tende a colpire anche trotelle di 20-30 g.), hanno portato ad un allungamento del periodo in cui la malattia presenta grave sintomatologia e causa maggiori perdite; infatti, in alcune realtà, oramai la malattia può essere considerata presente lungo tutto l'anno, con perdite ancora considerevoli anche nel periodo tardo autunnale o invernale (Prearo, 2003). La prevalenza è molto alta negli allevamenti di pianura riforniti da acque di superficie, con una mortalità media del 30-50% tra maggio ed ottobre (Prearo, 2002). La gravità della lattococcosi impone di adottare diversi metodi di profilassi e terapia (Nakai *et al.*, 1999; Nakai & Park, 2002). Oltre alle buone pratiche di allevamento, le uniche armi utilizzabili sono la prevenzione tramite vaccinazione (che contrasta l'insorgenza

dell'infezione potenziando la risposta immunitaria dell'animale) e la terapia, tramite la somministrazione di antibiotici specifici. Sia l'una che l'altra hanno comunque dei limiti che giocano a favore dell'evolversi della malattia. La terapia antibiotica, effettuata con mangime medicato, è limitata dai seguenti fattori: la precoce comparsa di anoressia (prima degli altri sintomi clinici), le continue ricadute dei soggetti debilitati, la difficoltà di poter utilizzare molecole sicuramente efficaci, il limitato numero di antibiotici ammessi dalla legislazione italiana, l'instaurarsi di fenomeni di antibiotico-resistenza (Schmidt *et al.*, 2000). La somministrazione ripetuta di antibiotici, oltre al costo ed all'impatto ambientale, comporta la presenza stabile di residui nel pesce che ne impediscono la commercializzazione durante l'intero periodo estivo (Ghittino *et al.*, 2002). Il grosso impatto economico di questa malattia e la crescente farmaco-resistenza del batterio, hanno imposto la necessità di sviluppare misure di tipo immunoprofilattico efficaci, durature e ben tollerate (Toranzo *et al.*, 1994; Ceschia *et al.*, 1997; Romalde *et al.*, 1999; Ghittino *et al.*, 2002). I vaccini finora prodotti sono stati tutti ottenuti tramite inattivazione dell'intera cellula batterica e quelli attualmente in sperimentazione prevedono anche l'utilizzo di adiuvanti, che sono costituiti da oli minerali e non, in grado di promuovere la risposta anticorpale degli animali. Essi, inoltre, sono privi di tossicità e non creano gravi reazioni nel punto di inoculo e negli organi, che potrebbero causare deprezzamento del prodotto commerciale. La modalità di somministrazione del vaccino che ha ottenuto i maggiori successi è quella che utilizza la via intraperitoneale. Un'iniezione, effettuata tramite siringhe autocaricanti, aventi aghi dimensionati in rapporto alla taglia dei pesce da vaccinare, viene effettuata nella parte ventrale del corpo. Anche e soprattutto in questo caso, la buona gestione consente di evitare sprechi e di utilizzare il vaccino migliore alle migliori condizioni (Prearo, 2003).

Scopo del presente lavoro è stato di valutare diverse formulazioni di vaccino stabulogeno, ottenuto mediante inattivazione di *L. garvieae* con formalina (bacterin), associandolo ad adiuvanti oleosi minerali e non minerali di nuova generazione, sia mediante prove sperimentali in acquario, sia con prove di campo presso alcune troticolture. A tal scopo, in accordo con l'Associazione Piscicoltori Italiani, dopo un'indagine sul territorio della Regione Veneto sono stati individuati due siti produttivi (allevamento A e B) in cui la malattia risultava endemica e in grado di causare gravi mortalità.

## MATERIALI E METODI

### I fase

Durante il periodo estivo del 2003, 100 soggetti di trota iridea sono stati prelevati da 11 allevamenti della Regione Veneto, che risultavano avere la malattia endemica. Sono stati prelevati esclusivamente animali che presentavano letargia, melanosi cutanea ed esoftalmo e ciascuno di essi è stato sottoposto ad esame anatomopatologico, parassitologico e batteriologico da rene, fegato e milza mediante semina diretta su Agar Sangue (AS). Le piastre sono state incubate a  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , per 48-72 ore. Dalle singole colonie sono state effettuate le prove di identificazione primaria (morfologia, presenza/assenza di alone emolitico e/o pigmento, colorazione di Gram, mobilità, Ossidasi, Catalasi, Arginina, Lisina, Ornitina, O/F, Vibriostat O129 da 10  $\mu\text{g}$  e 150  $\mu\text{g}$ ). Una volta individuato il genere, si procedeva con le prove di crescita differenziata (a  $10^\circ\text{C}$ ,  $25^\circ\text{C}$ ,  $37^\circ\text{C}$ ,  $45^\circ\text{C}$ ; 0%, 3%, 6,5%, 8% di NaCl; pH 9,6) e biochimiche secondarie mediante l'utilizzo dei sistemi miniaturizzati Rapid ID STREP (bioMerieux). In caso di sospetto di *L. garvieae*, al fine di discriminarlo da *L. lactis lactis* che fenotipicamente è ad esso sovrapponibile, sono state effettuate le prove di fermentazione della salicina, di antibiotico sensibilità nei confronti della clindamicina (Elliot & Facklam, 1996) e di siero agglutinazione rapida su vetrino (S.A.R.) mediante antisieri

policlonali di coniglio forniti dal Laboratorio di Ittiopatologia e Acquacoltura dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta.

## **II fase**

### **Preparazione delle formulazioni vaccinali –**

Per la produzione dei vaccini sperimentali sono stati utilizzati i ceppi di *Lactococcus garvieae* n° 40/I04 (allevamento A) e 508/I03 (allevamento B) conservati in cryobanks alla temperatura di  $-80^{\circ}\text{C}$  allestendo delle brodoculture in Tryptone Soy Broth (TSB) incubate a  $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  per 24 ore. Successivamente è stata aggiunta formalina commerciale diluita in ragione dello 0,3% per inattivare l'antigene (Formalin Killed Cells o Bacterin), lasciando agire per 24 ore a temperatura ambiente e miscelando la sospensione mediante un agitatore magnetico. I vaccini formulati sono stati titolati mediante analisi spettrofotometrica della torbidità (Ultrospec 3000 UV/visible spectrophotometer - Pharmacia Biotech) utilizzando come standard di riferimento per la taratura dell'apparecchio i valori 0,5, 1 e 1,5 della scala McFarland (bioMerieux). Una volta titolate, le soluzioni vaccinali sono state miscelate con ISA 763 AVG<sup>®</sup> e ISA 563 VG<sup>®</sup> (oli non minerali) per la prova in acquario e ISA 763 AVG<sup>®</sup> e ISA 50V<sup>®</sup> (olio minerale) per le prove di campo sempre come emulsione water in oil (W/O). Gli adiuvanti ISA 563 VG<sup>®</sup> e ISA 50V<sup>®</sup> sono stati emulsionati nel rapporto antigene/adiuvante 50/50, mentre per l'adiuvante ISA 763 AVG<sup>®</sup> la miscelazione con il bacterin è stata effettuata nel rapporto di 30/70. Tutti i vaccini sono stati mantenuti in agitazione per 48 ore a temperatura ambiente e successivamente stoccati in cella frigorifero a  $4 \pm 3^{\circ}\text{C}$ . Nell'allevamento B un gruppo (Vasca 1S) è stato vaccinato con un vaccino stabulogeno formulato (Bacterin) prodotto, con protocollo analogo al nostro, dall'Istituto Zooprofilattico del Piemonte, Liguria, Valle d'Aosta di Torino. Per ciascuno dei vaccini un'aliquota di 10 ml è stata sottoposta alle seguenti prove:

- sterilità: inoculando Tryptone Soy Agar (TSA), Tryptone Soy Broth + estratto di lievito (TSB + YE), Agar sangue (AS), Sabouraud (SDA) e Thioglicolato (THG) e mantenendoli a  $22^{\circ}\text{C}$  e  $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  per 7 gg.;

- tossicità: inoculando 0,2 ml i.p a 5 topini di 15-20 gg. e tenendoli in osservazione per 15 gg.;

- innocuità su animali di destinazione: inoculando 0,2 ml i.p a 52 trote iridee del peso di 30 g. e tenendole in osservazione per 21 gg. Prima di inocularli sono stati fatti acclimatare per 10 giorni in 4 vasche da 70 litri (13 soggetti per vasca a  $10^{\circ}\text{C}$  mantenuti a digiuno per i primi 5 giorni, successivamente alimentati tramite pellet commerciale una volta al dì con razione di mantenimento). Su questi è stata iniettata per via intraperitoneale la soluzione vaccinale da provare secondo il seguente schema:

Vasca 1: bacterin + adiuvante ISA 763 AVG<sup>®</sup>

Vasca 2: bacterin + adiuvante ISA 563 VG<sup>®</sup>

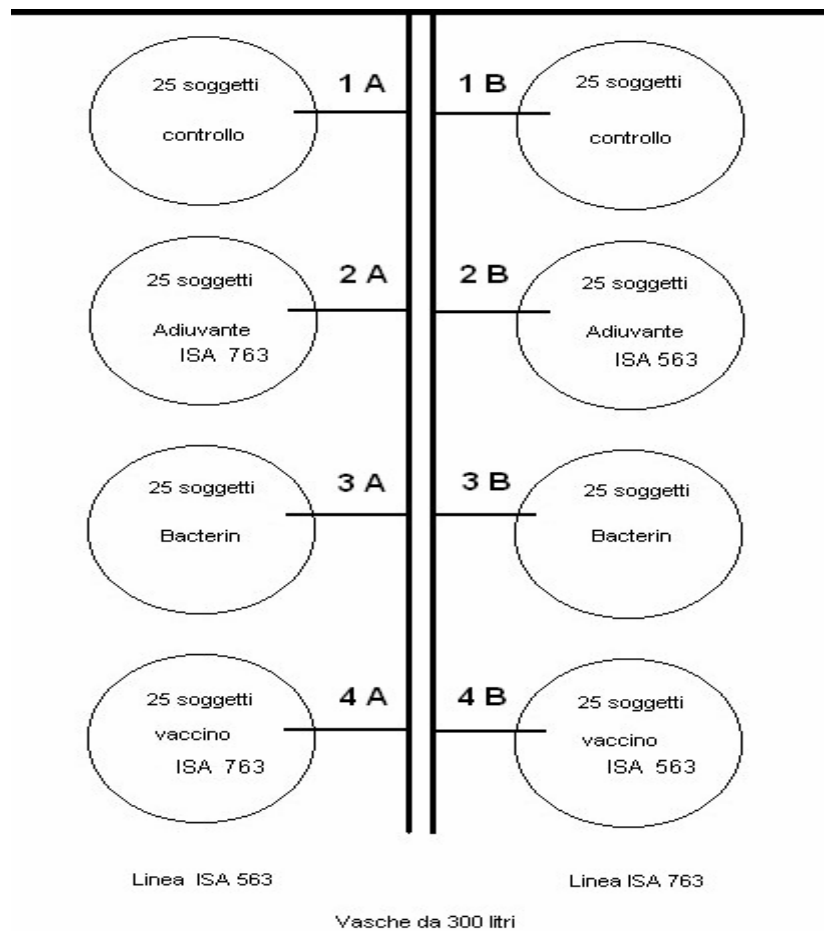
Vasca 3: solo bacterin;

Vasca 4: controllo con soluzione fisiologica.

### **Prove di vaccinazione e di protezione in acquario –**

Successivamente, per effettuare la prova di efficacia dei vaccini, sono stati introdotti 200 soggetti di  $50 \pm 10$  grammi. Una volta acclimatati a digiuno per 5 giorni, sono stati distribuiti in 8 vasche di 300 litri (con densità di circa 5,4 Kg per  $\text{m}^3$ ) con acqua a temperatura di  $10 \pm 1^{\circ}\text{C}$ . Per tutta la durata dell'esperimento le trote sono state alimentate con razione di mantenimento composta da pellet commerciale. La temperatura è stata fatta salire lentamente a  $15 \pm 1^{\circ}\text{C}$  prima della vaccinazione. Per quanto riguarda il flusso per tutta la durata della prova si è mantenuto un ricambio idrico di 0,2 litri/sec. Al momento della vaccinazione nelle

prime due vasche (1A e 1B) sono stati stabulati i controlli, iniettati per via intra-peritoneale con 0,2 ml di una soluzione di NaCl 0,9%. Nelle vasche 2A e 2B i soggetti sono stati inoculati solo con adiuvante: 0,2 ml i.p./capo (25 soggetti con ISA 763 AVG<sup>®</sup> e 25 con ISA 563 VG<sup>®</sup>), mentre nelle vasche 3A e 3B erano stabulati i soggetti vaccinati con il solo Bacterin senza adiuvante: 0,2 ml i.p./capo. Infine nelle ultime due vasche (4A e 4B) erano presenti 25 soggetti vaccinati rispettivamente con la miscela vaccinale contenente ISA 763 AVG<sup>®</sup> e con vaccino + ISA 563 VG<sup>®</sup> (vedi schema 1).



Schema 1 – Prove di vaccinazione in acquario.  
*Scheme 1 – Vaccination trials in aquarium.*

Tutte le iniezioni sono state eseguite previa anestesia con MS 222 (Metansulfonato di tricaina) a concentrazioni pari a 50 ppm, disciolto in contenitori di 30 litri d'acqua dove venivano poste 10 trote per volta. Settanta giorni dopo la vaccinazione tutti i pesci delle otto

vasche, la cui temperatura era stata portata a  $18\pm 1^{\circ}\text{C}$  per simulare le condizioni di allevamento, sono state sottoposte ad infezione con il ceppo stabulogeno virulento scongelato e incubato a  $22^{\circ}\text{C}$  per 24 ore in HIB. Una volta controllato il titolo mediante analisi spettrofotometrica della torbidità, la sospensione è stata diluita con soluzione fisiologica 0,9% NaCl al fine di ottenere una concentrazione finale di  $10^5$  UFC/ml. Ogni soggetto è stato sottoposto, previa anestesia, ad una iniezione intra-peritoneale con 0,1 ml (pari a  $10^4$  UFC/soggetto) della sospensione infettante.

Per 30 giorni sono state registrate le mortalità giornaliere dei singoli gruppi al fine di ricavare la mortalità totale e la Relative Per cent Survival (RPS)

$$\text{RPS} = [1 - (\text{n}^{\circ} \text{ morti fra i vaccinati} : \text{n}^{\circ} \text{ morti del controllo})] \times 100$$

e i soggetti morti sono stati sottoposti a esame anatomopatologico e batteriologico.

### Prove di vaccinazione e di protezione di campo –

Le prove di campo si sono svolte presso due tritocolture in provincia di Treviso socie dell'Associazione Piscicoltori Italiani, nelle quali non era presente la malattia in forma conclamata.

Nel primo impianto (allevamento A) sono state utilizzati 3 gruppi di trote:

- 1 - 10.000 trote iridee del peso medio di  $170 \pm 10$  g., densità pari a  $14,4 \text{ Kg/m}^3$ ;
- 2 - 9.000 trote iridee del peso medio di  $170 \pm 10$  g., densità pari a  $12,75 \text{ Kg/m}^3$ ;
- 3 - 12.000 trote iridee del peso medio di  $170 \pm 10$  g., densità pari a  $17 \text{ Kg/m}^3$ .

Tutti i gruppi erano stabulati in vasche da  $120 \text{ m}^3$ , con acqua di pozzo avente temperatura di  $13\pm 1^{\circ}\text{C}$  ed erano alimentati giornalmente secondo i razionamenti di accrescimento dettati dalla ditta mangimistica. Nella prima settimana di Aprile sono stati vaccinati, previa anestesia con 75 ppm di MS 222: i primi 2 gruppi mediante iniezione i.p di 0,2 ml di vaccino contenente l'adjuvante ISA 763 AVG<sup>®</sup> e ISA 50V<sup>®</sup> rispettivamente; il terzo gruppo non vaccinato fungeva da controllo. Circa 60 giorni dopo la vaccinazione tutti i gruppi sono stati spostati in vasche in terra (race-way) alimentate da acqua di derivazione del fiume Sile con temperatura dell'acqua di  $16\pm 1^{\circ}\text{C}$ .

Nel secondo impianto (allevamento B) è stato vaccinato uno stock di riproduttori secondo il seguente schema vaccinale (Schema 2).

VASCA 1 D 1.250 riproduttori di 400-500 g. Vaccino ISA 50V <sup>®</sup>	VASCA 1 S 5.625 riproduttori di 170-200 g. Bacterin
VASCA 2 D 2.500 riproduttori di 400-500 g. Vaccino ISA 763 AVG <sup>®</sup>	VASCA 2 S 4.250 riproduttori di 400-500 g. Vaccino ISA 50 V
VASCA 3 D 2.850 riproduttori ~ 1 kg. Vaccino ISA 763 AVG <sup>®</sup>	VASCA 3 S 3.500 riproduttori di 400-500 g. Vaccino ISA 763 AVG <sup>®</sup>
VASCA 4 D 2.900 riproduttori ~ 1 kg. Vaccino ISA 763 AVG <sup>®</sup>	VASCA 4 S 5.750 Riproduttori di 700-800 g. Vaccino ISA 50 V <sup>®</sup>

Schema 2 - Gruppi di animali vaccinati nell'allevamento B.  
*Scheme 2 - Groups of animals vaccinated in farmed B.*

10.000 soggetti di 300-400 g. fungevano da controllo non vaccinato in una vasca adiacente. Tutte le vasche erano alimentate con acqua di derivazione del fiume Sile e la temperatura oscillava tra i  $16\pm 1^{\circ}\text{C}$  (maggio-giugno) e i  $20\pm 1^{\circ}\text{C}$  (luglio-settembre). Gli animali sono stati mantenuti in osservazione giornaliera per un periodo di 180 giorni (allevamento A) e 120 giorni (Allevamento B) post vaccinazione, durante i quali sono stati registrati i parametri ambientali, i segni clinici e la mortalità. Nell'allevamento A mensilmente sono stati fatti prelievi di sangue da 30 soggetti per ciascun gruppo vaccinato per valutare la sieroconversione e l'andamento del titolo anticorpale specifico per *L. garvieae* nel corso della stagione estiva mediante la tecnica di microagglutinazione lenta in piastra.

**Titolazione anticorpi anti-*Lactococcus garvieae* su siero di trota mediante microagglutinazione lenta su piastra –**

Preparazione dell' antigene: una perlina del ceppo di campo n° reg. 40/I04 conservato a  $-80^{\circ}\text{C}$  in cryobank è stata fatta crescere in 2 ml di HIB. Dopo incubazione per 24 ore a  $22^{\circ}\text{C}$  si è eseguita una semina per il controllo della purezza in Agar sangue. Successivamente sono state seminate una decina di piastre di Agar sangue, partendo dallo stesso brodo, al fine di ottenere una patina uniformemente distribuita. Le piastre sono state incubate a  $22^{\circ}\text{C}$  per 24 ore, quindi si è raccolta la patina batterica stemperandola in soluzione fisiologica fino ad ottenere una concentrazione di  $10^9$  UFC/ml pari a D.O. 1 mediante lettura spettrofotometrica a 540 nm.

Preparazione della micropiastra: sono state utilizzate delle piastre da 96 pozzetti con fondo ad U preparate nel seguente modo:

- 1- 50  $\mu\text{l}$  di soluzione fisiologica in tutti i pozzetti esclusa la colonna 1 e la colonna 12;
- 2- 50  $\mu\text{l}$  di siero in esame sul primo pozzetto, un campione per riga, e poi dal secondo pozzetto all'undicesimo, diluizioni scalari per raddoppio, eliminando i 50  $\mu\text{l}$  finali ottenendo così delle diluizioni del siero in esame da tale e quale (Madre) a 1:1028;
- 3- nella fila 12 i controlli con solo soluzione fisiologica, controllo positivo con il siero di coniglio anti-*Lactococcus garvieae* utilizzato nelle agglutinazioni rapide su vetrino diluito 1:200 in soluzione fisiologica e un controllo negativo con un siero di trota negativo diluito 1:10 in soluzione fisiologica;
- 4- su tutti i pozzetti sono stati aggiunti 50  $\mu\text{l}$  di sospensione batterica;
- 5- le piastre sono state agitate mediante l'utilizzo di una piastra oscillante e successivamente incubate una notte a  $22^{\circ}\text{C}$ ;
- 6- dopo l'incubazione è stata effettuata la lettura della piastra con luce incidente e l'ausilio di un apposito lettore (Cook Microtiter System) considerando come reazione negativa la presenza di un bottone netto e ben definito sul fondo del pozzetto (precipitato batterico) e come positiva la presenza di una torbidità diffusa o di un agglutinato irregolare.

Per ogni singolo campione è stata considerata la massima diluizione in grado di dare positività all'agglutinazione. Il risultato finale è stato espresso come media dei trenta campioni per ciascun prelievo.

Analisi statistica: tutti i dati sono stati valutati mediante il test del chi-quadrato e l'analisi della varianza, considerandoli statisticamente significativi qualora P fosse inferiore a 0,05 ( $P < 0,05$ ).

## RISULTATI

### I fase

In totale sono state esaminate 100 trote di peso variabile dai 200-800 g. Durante l'esame necroscopico, oltre all'iperpigmentazione cutanea e all'esoftalmo solitamente bilaterale (pop-eye), si sono osservate emorragie oculari, emorragie a carico della cute e delle pinne, pericardite, emorragie a carico di fegato e vescica natatoria, splenomegalia ed enterite emorragica di entità variabile da soggetto a soggetto. L'esame parassitologico è sempre risultato negativo, mentre 43 soggetti sono risultati positivi per *L. garvieae*, 2 per *L. lactis lactis* e 45 trote erano negative. *L. garvieae* è stato isolato dal rene di 40 trote iridee, dalla milza e dal fegato di 39 soggetti, mentre in 30 animali tale patogeno è stato ritrovato in fase setticemica contemporaneamente da rene, milza e fegato. Tutti i 43 ceppi di *L. garvieae* presentavano le seguenti caratteristiche biochimiche: colonie opache, biancastre, di circa 1-2 mm di diametro, con alone  $\alpha$  emolitico, cocchi Gram +, a corta catena, catalasi e ossidasi negativi, immobili. Le prove di crescita differenziata (a 10, 25, 37 e 45°C; a 0%, 3%, 6,5%, di NaCl; a pH 9,6) sono risultate tutte positive. Tutti i ceppi di *L. garvieae* sono risultati resistenti alla Clindamicina, in grado di fermentare la salicina e positivi alla SAR.

### II fase

#### **Preparazione delle formulazioni vaccinali –**

Tutti i controlli di sterilità sono risultati favorevoli con assenza di crescita sia di contaminanti batterici che di eventuali miceti. Nessuno dei topini inoculati ha manifestato segni clinici o lesioni anatomopatologiche, né a breve termine (48-72 ore), né dopo 15 gg. di osservazione. Durante le prove di tossicità nelle trotelle di 30 g. si è verificata la morte di un soggetto dopo 15 giorni, mentre l'esame istologico ha evidenziato solamente una modesta congestione degli organi ed infiltrazione linfocitaria del tessuto periviscerale epatico in alcuni di essi (5/52).

#### **Prove di vaccinazione e di protezione in acquario –**

Nella prova in acquario gli animali trattati con il vaccino addizionato con ISA 763 AVG<sup>®</sup> hanno dimostrato una minore mortalità e una migliore RPS (72,7%) rispetto a quelli vaccinati solo con il bacterin della Vasca 3A (51,8%) o con l'altro tipo di adiuvante (62,5%). Solo il gruppo della Vasca 3B (bacterin) ha avuto una mortalità e una RPS (72,5%) sovrapponibile a quella degli animali della Vasca 4B trattata con il vaccino + adiuvante ISA 763 AVG<sup>®</sup>.

Tutti gli animali morti hanno presentato sintomi clinici e lesioni anatomopatologiche riferibili a Lattococcosi e dal rene di ciascun soggetto è stato isolato *L. garvieae*.

#### **Prove di vaccinazione e di protezione di campo –**

##### Allevamento A

A 180 giorni post vaccinazione la situazione era la seguente:

- gruppo 1) - 8.470 trote iridee del peso medio di  $613 \pm 10$  g., 1.530 soggetti morti (15,3% del totale), RPS 74,5%;
- gruppo 2) - 5.490 trote iridee del peso medio di  $588 \pm 10$  g., 3.710 soggetti morti (41,2% del totale) RPS 31,3%;
- gruppo 3) - 7.200 trote iridee del peso medio di  $724 \pm 10$  g., 4.800 soggetti morti (60% del totale).

Le differenze tra i gruppi sono risultate statisticamente significative e, data la numerosità dei campioni, si ritengono estendibili anche all'intera popolazione.

Allevamento B

I risultati della mortalità e delle RPS dell'allevamento B sono riassunti nella Tabella 1.

Le differenze tra i gruppi sono risultate statisticamente significative e, data la numerosità campionaria, si ritengono estendibili anche all'intera popolazione.

NUMERO VASCA	MORTALITA' TOTALE	MORTALITA' %	RPS (%)
VASCA 1 D (ISA 50V <sup>®</sup> )	315	25,2	68,5
VASCA 2 D (ISA 763 AVG <sup>®</sup> )	144	5,8	92,8
VASCA 3 D (ISA 763 AVG <sup>®</sup> )	24	7,9	90,1
VASCA 4 D (ISA 763 AVG <sup>®</sup> )	702	17,2	78,4
VASCA 1 S (BACTERIN)	720	12,8	84,0
VASCA 2 S (ISA 50V <sup>®</sup> )	253	6,0	92,6
VASCA 3 S (ISA 763 AVG <sup>®</sup> )	96	2,7	<b>96,6</b>
VASCA 4 S (ISA 50V <sup>®</sup> )	344	6,0	92,5
VASCA CONTROLLO	8.000	80	

Tabella 1 - Mortalità totale e RPS a 120 giorni post vaccinazione.

*Table 1 - Total mortality and RPS 120 days after vaccination.*

**Titolazione anticorpale mediante microagglutinazione lenta in piastra –**

I risultati della titolazione anticorpale sono riportati nella Tabella 2 e nel Grafico 1.

Vaccino	08/04 Giorno della vaccinazione	22/04	12/05	11/06	20/07	07/09
ISA 763 AVG <sup>®</sup>	<b>1,6</b>	<b>2,89</b>	<b>11,6</b>	<b>29</b>	<b>7,81</b>	<b>5,02</b>
ISA 50 V <sup>®</sup>	<b>1,6</b>	<b>n.d.</b>	<b>n.d.</b>	<b>174,4</b>	<b>148,8</b>	<b>76,57</b>

n.d. = non disponibili

Tabella 2 - Titoli anticorpali medi in soggetti vaccinati nell'allevamento A.

*Table 2 - Average antibody titration in trout vaccinated by farm A.*

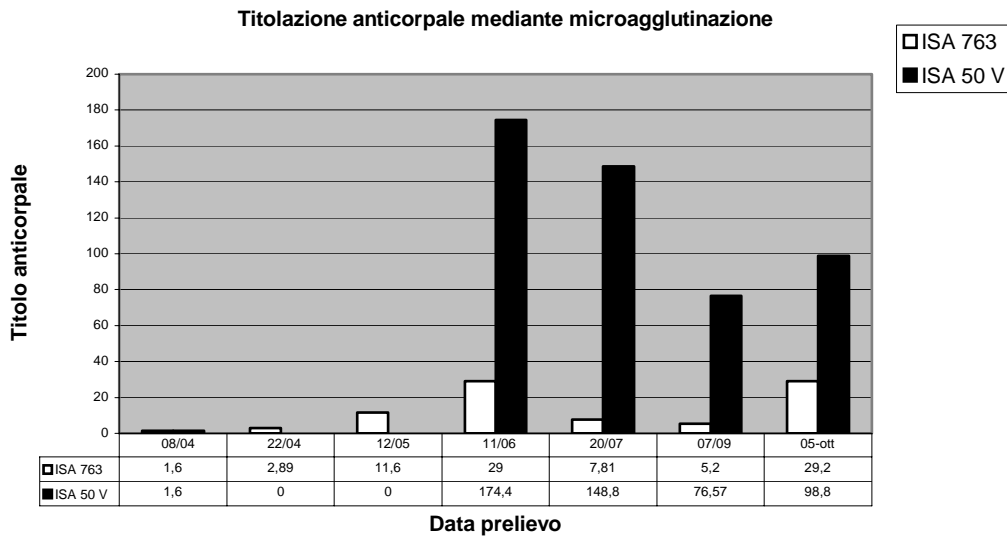


Grafico 2 - Titoli anticorpali medi.  
Graphic 2 - Average antibody titration.

## DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Dall'indagine svolta presso alcune trocolture del Veneto (11 impianti) è risultata una prevalenza della malattia significativa, con il 100% delle aziende infette e una positività del 43% su un totale di 100 trote iridee analizzate. Un altro dato interessante è costituito dal fatto che quasi nella totalità dei casi *L. garvieae* è stato isolato in purezza, in assenza di altri patogeni e nel 30% dei casi in forma setticemica con contemporaneo interessamento di rene, milza e fegato, a dimostrazione della notevole patogenicità per la trota iridea di questo cocco Gram positivo. Tutte le prove biochimiche e sierologiche hanno dato risultati costanti e non si sono verificate differenze fenotipiche tali da far sospettare che si trattasse di ceppi diversi, in linea con quanto già riscontrato da altri autori sia a livello nazionale che internazionale. La scelta di utilizzare il ceppo 40/I04 per l'infezione in acquario è stata dettata dall'anamnesi recente e remota dell'allevamento A, dalla quale risultava che tale ceppo era estremamente virulento. L'allevamento B, invece, oltre ad avere la malattia endemica da diversi anni con punte di mortalità superiore all'80% nei lotti colpiti, presentava un'altra caratteristica interessante per la buona riuscita dell'indagine. In tale impianto, infatti, erano disponibili circa 25.000 riproduttori di taglie variabili dai 200 g. (nuova rimonta interna) ai 700-800 g. (riproduttori pronti per la spremitura invernale) oltre a circa 5.000 animali di peso superiore a 1 kg. (riproduttori della precedente stagione). Essendo la malattia più temibile nelle taglie maggiori, si è preferito restringere l'indagine a questi due impianti, in quanto complessivamente il numero di animali superava le 60.000 unità. Un terzo impianto è stato scartato in quanto offriva animali di taglia inferiore (circa 100 g.) e nei primi giorni di aprile aveva già manifestato segni clinici tipici della malattia.

Durante i controlli dei lotti vaccinali nessuno dei topini inoculati ha manifestato segni clinici o lesioni anatomopatologiche, né a breve termine (48-72 ore), né dopo 15 giorni di

osservazione. Durante le prove di tossicità nelle trotelle di 30 g., si è verificata la morte di un solo soggetto dopo 15 giorni e l'esame istologico, effettuato al termine del periodo di osservazione su tutti i soggetti sopravvissuti, ha evidenziato solamente una modesta congestione degli organi ed infiltrazione linfocitaria del tessuto periviscerale epatico in alcuni soggetti (5/52). Tutto ciò permette di concludere che sia gli adjuvanti iniettati (ISA 763 AVG<sup>®</sup> e ISA 563 VG<sup>®</sup> oli non minerali) sia l'associazione vaccino + adjuvante o il semplice Bacterin non sono risultati tossici, né hanno dato luogo a reazioni infiammatorie tali da danneggiare gli animali.

Per quanto riguarda le prove di vaccinazione in acquario, a seguito del challenge con ceppo virulento effettuato 70 giorni post vaccinazione, nel giro di 48-72 ore gli animali hanno manifestato sintomatologia clinica e lesioni anatomopatologiche tipiche della malattia. La morte del 100% dei soggetti del gruppo controllo è avvenuta nel giro di 7-8 giorni. L'iniezione dei singoli adjuvanti non ha dato alcun livello di protezione, a conferma dell'importanza di disporre di un antigene specifico per ottenere una risposta immunitaria mirata. Sono stati positivi anche i risultati ottenuti con il Bacterin, in particolar modo nei pesci della vasca 3B con RPS del 72,5% perfettamente sovrapponibile a quella degli animali trattati con il vaccino + ISA 763 AVG<sup>®</sup> (RPS 72,7%). Anche la RPS degli animali trattati con il vaccino + ISA 563 VG<sup>®</sup> è risultata buona, pari al 62,5%, mentre nella Vasca 3A (solo bacterin) il risultato finale di 51,8% potrebbe essere stato inficiato da un improvviso aumento della temperatura nella vasca di stabulazione, fino a 20°C, protrattosi per circa 24 ore. Data la brevità del periodo di osservazione (30 gg.) non è stato possibile valutare se l'efficacia dei vaccini si sarebbe mantenuta per periodi più lunghi.

Per quanto riguarda l'allevamento A, il gruppo 1 vaccinato con l'ausilio dell'adjuvante ISA 763 AVG<sup>®</sup> ha manifestato una mortalità finale del 15,3% e una RPS del 74,5%, dimostrandosi il migliore dei due trattamenti. Il risultato poco confortante del secondo gruppo (RPS 31,3%), trattato con il vaccino adjuvato con ISA 50V<sup>®</sup>, è stato causato da un grave episodio di Setticiemia Emorragica Virale (SEV) scatenatosi 15 giorni post vaccinazione, probabilmente a seguito dello stress della manipolazione e della vaccinazione stessa. Una volta introdotti in vasche alimentate direttamente dal fiume Sile, infatti, entrambi i gruppi hanno superato positivamente la stagione estiva registrando una mortalità sovrapponibile. La mortalità media in impianto, comunque, negli anni precedenti non era mai stata inferiore al 60% nei soggetti non trattati. La RPS del gruppo 2 (31,3%) va quindi considerata scarsamente attendibile, proprio a causa del grave episodio di infezione virale che ha afflitto gli animali nel primo periodo della prova. I titoli anticorpali, infatti, dimostrano chiaramente una curva di crescita tra maggio e luglio, ma purtroppo, sempre a causa dell'episodio di SEV, non sono disponibili il 2° e 3° prelievo. L'andamento dei valori fa supporre che anche nei primi due mesi i titoli anticorpali fossero nettamente superiori rispetto agli animali vaccinati con ISA 763 AVG<sup>®</sup>.

Per quanto riguarda l'allevamento B, nonostante i gruppi non fossero perfettamente omogenei, dalla Tabella 1 risulta evidente che la migliore RPS è stata ottenuta con il vaccino addizionato con ISA 763 AVG<sup>®</sup> (Vasca 3S con RPS 96,6%; Vasca 2D con RPS 92,8%; Vasca 3D con RPS 90,1%), anche se gli animali delle vasche 2S e 4S, trattati con ISA 50 V<sup>®</sup>, hanno ottenuto comunque ottimi livelli di protezione (RPS di 92,6% e 92,5% rispettivamente). Le vasche 1D e 4D, invece, hanno presentato una discreta mortalità probabilmente a causa di errori nella tecnica di vaccinazione e per la precoce comparsa di Lattococcosi in alcuni soggetti. A causa di problemi burocratici relativi all'autorizzazione ad effettuare la sperimentazione, infatti, la vaccinazione è stata iniziata ai primi di giugno, quando la temperatura dell'acqua era già superiore ai 15°C e quindi in grado di scatenare la malattia nei soggetti più stressati o debilitati. L'utilizzo di adjuvanti, quindi, si è confermato una scelta vincente nell'immunoprofilassi della lattococcosi in quanto ha consentito di

ottenere i seguenti risultati: assenza quasi totale di reazioni infiammatorie e di effetti collaterali negli animali trattati con ISA 763 AVG<sup>®</sup> e ISA 563 VG<sup>®</sup> (oli non minerali) e scarsa reattività a breve-medio termine anche nei soggetti trattati con ISA 50V<sup>®</sup> (olio minerale); buoni livelli di protezione, con RPS elevate sia nella prova in acquario, sia in quelle di campo; elevati titoli anticorpali con il vaccino + ISA 50V<sup>®</sup>, a conferma di come l'olio minerale solitamente sia in grado di stimolare una maggiore reattività immunitaria negli animali, tenendo però anche conto del fatto che il rapporto antigene/adjuvante era di 50/50; ottimi livelli di protezione del vaccino + ISA 763 AVG<sup>®</sup> in animali di diversa pezzatura e in due differenti realtà produttive (ingrasso e salmonatura nell'allevamento A; gestione del parco riproduttori nell'allevamento B) a dispetto di un titolo anticorpale significativamente inferiore rispetto a quello degli animali trattati con l'adjuvante ISA 50V<sup>®</sup>. Sfortunatamente non è stato possibile valutare il titolo anticorpale dei riproduttori in quanto, trattandosi di animali pregiati ed estremamente delicati, si è preferito non stressarli ulteriormente con eccessive manipolazioni.

#### RINGRAZIAMENTI

Il presente lavoro è stato finanziato dalla Regione Veneto nell'ambito del Piano nazionale per lo sviluppo dell'acquacoltura in acqua dolce (Legge 21 maggio 1998, n. 164 - Progetto n. 08/L164/2002) e svolto in collaborazione con l'Associazione Piscicoltori Italiani.

#### BIBLIOGRAFIA

- Austin B. & Austin D.A. (1999). Bacterial fish pathogens: diseases of farmed and wild fish. 3<sup>o</sup> edition. *Springer Praxis*: 122-125.
- Boomker J., Imes G.D., Cameron C.M., Naude T.W. & Schoonbee H.J. (1979). Trout mortalities as a result of *Streptococcus* infection. *Onderstepoort J. Vet. Med.*, 46: 71-78.
- Carson J., Gudkovs N. & Austin B. (1993). Characteristics of an *Enterococcus*-like bacterium from Australia and South Africa, pathogenic for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Fish Dis.*, 16: 381-388.
- Carson J. & Munday B.L. (1990). Streptococcosis – an emerging disease in aquaculture. *Australian Aquaculture*, 5: 32-33.
- Ceschia G., Giorgetti G., Giavenni R. & Sarti M. (1992). A new problem for Italian trout farm: Streptococcosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 12, 2: 71.
- Ceschia G., Giorgetti G., Mazzolini E., Danielis L. & Passera A. (1997). Vaccinazione contro la Streptococcosi in trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*) allevata. *Boll. Soc. It. Patol. Ittica*, 22: 30-35.
- Chang P.H., Lin C.W. & Lee C.W. (2002). *Lactococcus garvieae* infection of cultured rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*) in Taiwan and associated biophysical characteristics and histopathology. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 22, 5: 319-327.
- Chen S.C., Liaw L.L., Su H.Y., Ko S.C., Wu C.Y., Chang H.C., Tsai Y.H., Yang R.L., Chen Y.C., Chen T.H., Lin-G.R., Cheng S.Y., Lin Y.D., Lee J.L., Lai C.C., Weng Y.J. & Chu S.Y. (2002). *Lactococcus garvieae*, a cause of disease in grey mullet, *Mugil cephalus*, in Taiwan. *J. Fish Dis.*, 25, 12: 727-732.

- Diler O., Altun S., Adiloglu A.K., Kubilay A. & Isikly B.J. (2002). First occurrence of Streptococcosis affecting farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Turkey. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 22: 21-26.
- Elliott J.A. & Facklam R.R. (1996). Antimicrobial susceptibilities of *Lactococcus lactis* and *Lactococcus garvieae* and a proposed method to discriminate between them. *J. Clin. Microbiol.*, 34, 5: 1296-1298.
- Ghittino C. & Prearo M. (1992). Segnalazione di Streptococcosi nella trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*) in Italia: nota preliminare. *Boll. Soc. It. Patol. Ittica*, 8: 4-9.
- Ghittino C., Prearo M., Latini M., Agnetti F., Accornero P., Cabra S. & Eldar A. (2002). Studi sulla vaccinazione contro la Lattococcosi nei salmonidi. *Boll. Soc. It. Patol. Ittica*, 33: 18-19.
- Kusuda R., Kawai K., Toyoshima T. & Komatsu I. (1976). A new pathogenic bacterium belonging to the genus *Streptococcus*, isolated from an epizootic of cultured yellowtail. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 42: 1345-1352.
- Kusuda R. & Komatsu I. (1978). A comparative study on fish pathogenic *Streptococcus* isolated from freshwater and saltwater fishes. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 44: 1073-1078.
- Kusuda R. & Salati F. (1993). Mayor bacterial diseases affecting mariculture in Japan. *Annual Rev. Fish Dis.*, 3: 69-85.
- Munday B.L., Jack D.L. & Schmidtke L. (1993). Pathogenicity of the species *Streptococcus* causing disease in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 13, 1: 25.
- Nakai T. & Park S.C. (2002). Bacteriophage therapy of infectious diseases in aquaculture. *Res. Microbiol.*, 153, 1: 13-18.
- Nakai T., Sugimoto R., Park K.H., Matsuoka S., Mori K., Nishioka T. & Maruyama K., (1999). Protective effects of bacteriophage on experimental *Lactococcus garvieae* infection in yellowtail. *Dis. Aquat. Org.*, 37, 1: 33-41.
- Palacios M.A., Zamora M.J., Velasquez J., Zamora E. & Duran A. (1993). Streptococcosi della trota iridea in Spagna. *Boll. Soc. It. Patol. Ittica*, 13: 7-10.
- Prearo M. (2002). Epidemiologia e prevenzione della lattococcosi e della vagococcosi in Europa. *API Informa: Maggio 2002*.
- Prearo M. (2003). La Lattococcosi nella trota iridea: la vaccinazione intraperitoneale. *API Informa: Dicembre 2003*.
- Romalde J.L., Magariños B. & Toranzo A.E. (1999). Prevention of streptococcosis in turbot by intraperitoneal vaccination. *J. Appl. Ichthyol.*, 15: 153-158.
- Sakai M., Kubota R., Atsuta S. & Kobayashi M. (1987). Vaccination of rainbow trout *Salmo gairdneri* against beta-haemolytic streptococcal disease. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 53: 1373-1376.
- Schmidt A.S., Bruun M.S., Dalsgaard I., Pedersen K. & Larsen. J.L. (2000). Occurrence of antimicrobial resistance in fish-pathogenic and environmental bacteria associated with four Danish rainbow trout farms. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 11: 4908-4915.
- Toranzo A.E., Devesa S., Heinen P., Riaza A., Nuñez S. & Barja J.L. (1994). Streptococcosis in cultured turbot caused by an *Enterococcus*-like bacterium. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, 14: 19-23.