

**Infezione sperimentale con *Flavobacterium psychrophilum*
in trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*)
per via intraperitoneale e per bagno**

*Experimental infection with Flavobacterium psychrophilum
in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss)
by intraperitoneal and bath challenges*

**Amedeo Manfrin^{1*}, Piero Tonon¹, Fabio Cervellione²,
Katia Qualtieri¹, Lucia Selli¹, Giuseppe Bovo¹**

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie - Legnaro (PD)

² Facoltà di Medicina Veterinaria – Università degli Studi di Milano

RIASSUNTO - *Flavobacterium psychrophilum* è un agente patogeno responsabile di gravi perdite nelle avannotterie. Diversi autori stanno da anni cercando di mettere a punto dei vaccini per contrastare la Flavobatteriosi, ma trattandosi di un microrganismo esigente risultano difficili sia la preparazione dell'inoculo sia le prove di infezione sperimentale. A tal riguardo abbiamo effettuato alcuni test al fine di determinare la LD_{50} di *F. psychrophilum* nei confronti di avannotti di trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*), utilizzando sia un ceppo di referenza sia un ceppo di campo isolato da avannotti durante un episodio clinico. In due prove sono stati effettuati inoculi per via i.p., nella prima iniettando gruppi di avannotti con concentrazioni finali di 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 batteri/pesce, mentre nella seconda con 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 batteri/pesce. Nella terza e quarta prova abbiamo testato l'infezione per bagno mediante l'immersione di gruppi di avannotti in sospensioni infettanti di 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 batteri/ml. Solo nella prima infezione per via i.p. è stato possibile determinare una LD_{50} pari a 10^4 batteri/pesce, mentre nelle altre tre occasioni la mortalità non è risultata significativa. Analoghi risultati sono stati ottenuti da altri autori in quanto, trattandosi di un microrganismo particolarmente esigente, difficile da conservare per lunghi periodi e che assume di frequente particolari caratteristiche di resistenza (*viable but non culturable bacteria*), la ripetibilità e riproducibilità delle infezioni sperimentali sono estremamente difficili da determinare.

SUMMARY - *Flavobacterium psychrophilum* is a pathogen responsible for great losses in the hatcheries. Many authors are trying to set vaccines against Flavobacteriosis, but preparation of inocule and infection challenges are both difficult being it an exigent microorganism. With regard to this, we have done some tests to reach the LD_{50} of *F. psychrophilum* towards rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fries, using both a reference strain (in the third challenge) and a wild type isolated from fries during a clinical event (in the others). In two tests inocules via i.p. are being done, in the first injecting groups of fries with final concentrations of 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 bacteria/fish, while in the second one with 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 bacteria/fish. During the third and fourth challenges, we have tested infection by bath plunging fries' groups into infective suspension of 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 bacteria/ml. Only after the first infection via i.p. it has been possible to reach a LD_{50} value of 10^4 bacteria/fish, while in the other occasions the mortality rate was not significant. Similar results have been obtained also by other authors because it is a particularly exigent microorganism, very difficult to conserve for long periods, and it changes often into unusual resistant forms (*viable but non culturable bacteria*), so that repeatability and reproducibility of experimental infections are extremely hard to be obtained.

Key words: *Flavobacterium psychrophilum*; *Oncorhynchus mykiss*; LD_{50} ; Bath challenge; I.p. infection.

* Corresponding Author: c/o Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Viale dell'Università, 10 – 35020 Legnaro (PD) – Italy. Tel.: 049-8084295; Fax: 049-8084392; E-mail: manfrin@izsvenezie.it

INTRODUZIONE

Negli ultimi decenni hanno assunto importanza nei pesci d'allevamento patologie per le quali l'effettivo ruolo patogeno degli agenti eziologici è stato solo di recente riconosciuto, quali le Flavobatteriosi, comunemente, ma impropriamente denominate "Mixobatteriosi". Tali agenti, inizialmente ritenuti a torto dei mixobatteri e successivamente considerati dei citofagali (generi *Cytophaga* e *Flexibacter*), sono ora inclusi nel genere *Flavobacterium*, che fa parte del cosiddetto gruppo dei batteri giallo-pigmentanti. I flavobatteri sono bacilli filamentosi dotati di movimenti reptanti, caratterizzati dal produrre potenti enzimi proteolitici che provocano estese necrosi ai tessuti (Ghittino, 1985; Inglis *et al.*, 1993; Austin & Austin, 1999).

Nei salmonidi sono responsabili della Flavobatteriosi branchiale e della Flavobatteriosi d'acqua fredda. La prima, sostenuta da *Flavobacterium branchiophila*, è una fra le cause di Malattia Branchiale, patologia multifattoriale molto comune nel novellame. La seconda, sostenuta da *F. psychrophilum* e detta anche Cold Water Disease (CWD), si sviluppa in acque con temperatura inferiore ai 18° C ed è la principale malattia batterica rinvenibile nelle avannotterie italiane. A differenza degli altri flavobatteri, *F. psychrophilum* viene considerato da molti autori come un patogeno primario per i giovani salmonidi. Già nelle uova embrionate può essere all'origine di una condizione che provoca morte dell'embrione, nota come rammollimento del guscio o Soft Egg Disease, mentre negli avannotti può determinare mortalità per idrope del sacco vitellino e ritardato suo assorbimento: gli adulti, infatti, sono portatori sani e il batterio è presente nel liquido ovarico. La Flavobatteriosi evolve generalmente in forma sistemica o in forma cutanea, ma nella stessa partita di pesci possono presentarsi entrambe. Nella Flavobatteriosi cutanea o Malattia del Peduncolo, più frequente in inverno quando la malattia tende a cronicizzare, sono caratteristiche le erosioni al peduncolo caudale e successivamente a tutto il corpo, oltre ad anemia e petecchie alle branchie. La forma sistemica o viscerale invece è favorita dagli sbalzi termici (soprattutto in primavera e in autunno) ed è conosciuta anche con il nome di Rainbow Trout Fry Syndrome (RTFS). Si tratta di una setticemia acuta che causa splenomegalia e congestione epatica e, nelle trotelle da 0,2 a 5 g., perdite medie del 15-20% (Ghittino & Pedroni, 2001).

Oltre che sui reperti anatomopatologici, la diagnosi di Flavobatteriosi si basa sull'esame batterioscopico, con allestimento di impronte di milza, colorazione di Gram ed osservazione, nell'ambito del parenchima splenico, di bacilli Gram negativi allungati (Sarti *et al.*, 1992). La conferma diagnostica dovrebbe prevedere l'isolamento dell'agente causale mediante prelievo dal rene, dalla milza e dal cervello, e la sua identificazione tramite caratterizzazione colturale e biochimica. *F. psychrophilum* è però un microrganismo esigente e il suo isolamento presenta delle difficoltà, non crescendo sugli ordinari terreni di coltura e a 22° C, ma esclusivamente su terreni selettivi addizionati di latte scremato e sodio acetato, con sviluppo di colonie gialle dopo 3-7 giorni di incubazione a 15-18° C. Inoltre sono frequenti i casi in cui il batterio, assumendo particolari forme di resistenza, pur presente non è coltivabile e quindi nemmeno reperibile tramite le comuni indagini batteriologiche sopra descritte (*viable but non culturable bacteria*).

Flavobacterium psychrophilum risulta resistente nei confronti di alcuni dei principali chemioterapici antibatterici, fatta eccezione per il cloramfenicolo, di cui è vietato l'utilizzo, e per le tetracicline e le penicilline semisintetiche. Particolarmente problematico risulta essere il controllo della forma sistemica di Flavobatteriosi, in quanto richiede una terapia basata sul concomitante impiego di bagni con composti disinfettanti (pratica non consentita) e mangime medicato. Inoltre, la terapia con mangime medicato determina, in genere, risultati insoddisfacenti in seguito alla precoce comparsa di anoressia e alle frequenti ricadute per fenomeni di antibiotico-resistenza.

A causa delle perdite economiche che gravano sulla troticoltura del nostro Paese e vista la sostanziale inefficacia dei comuni presidi chemioterapici, risulterebbe di particolare importanza lo sviluppo di vaccini da somministrare per via endoperitoneale alle madri prima del periodo riproduttivo o per immersione nel novellame. Scopo del presente lavoro è stato quello di tentare di determinare la DL_{50} di *F. psychrophilum* nei confronti di avannotti di trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*) da utilizzare nell'ambito di protocolli sperimentali di valutazione di efficacia di vaccini contro la flavobatteriosi dei salmonidi.

MATERIALI E METODI

Le prove di infezione sperimentale sono state eseguite utilizzando un ceppo di *Flavobacterium psychrophilum* di riferimento (1947 NCIMB) (National Collection of Industrial Marine Bacteria) e un ceppo di campo (53/03) isolato presso l'Unità Operativa Batteriologia del Laboratorio di Ittiopatologia – Centro di Riferenza Nazionale per le malattie dei pesci dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie - nell'ambito di un monitoraggio svoltosi nella primavera del 2003 presso alcune troticolture del Triveneto. Tale ceppo è stato isolato da avannotti di trota iridea di circa 2 g., durante un episodio clinico, mediante semina dalla milza in Anacker Ordal Broth Enriched (AOBE) incubato a $15 \pm 2^\circ \text{C}$ per 7 giorni e un successivo passaggio in Anacker Ordal Agar Enriched (AOAE).

Per l'identificazione biochimica sono state effettuate le prove colturali/biochimiche descritte da Daalsgard & Lorenzen (Tabella 1) e quelle in micrometodo previste dal sistema miniaturizzato API CH 50 (bioMérieux). In attesa di essere utilizzati per l'infezione, i ceppi sono stati stoccati in cryobanks a -80°C .

Gli avannotti sono stati acquistati dalla troticoltura sperimentale dell'Istituto Agrario di S. Michele all'Adige, indenne da *F. psychrophilum*. Ogni gruppo acquistato è stato fatto acclimatare per tre settimane; il giorno precedente e successivo ad ogni prova i soggetti sono stati tenuti a digiuno.

Ogni gruppo è stato stabulato in vasche tronco coniche di circa 40 litri, con flusso dell'acqua a perdere e temperatura di $11 \pm 1^\circ \text{C}$.

Crescita microbica nei diversi terreni -

Al fine di valutare il terreno liquido più adatto a garantire una crescita del microrganismo in tempi abbastanza brevi (3-5 gg) e un titolo soddisfacente dell'inoculo, sono state eseguite tre prove preliminari per testare tre differenti terreni liquidi:

- Anacker Ordal Broth (AOB): triptofano 0,05%, estratto di lievito 0,05%, estratto di manzo 0,02%, sodio acetato 0,02% (pH 7,2-7,4);
- Anacker Ordal Broth Enriched (AOBE): AOB arricchito con 0,5% di triptofano e 5% di siero fetale bovino;
- Tryptone-Yeast Extract Salts Broth (TYES broth): triptofano 0,4%, estratto di lievito 0,005%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,05%, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,05% (pH 7,2-7,4).

In ciascuna provetta, contenente 15 ml di brodo, è stata introdotta una colonia di *F. psychrophilum* (ceppo di riferimento 1947 NCIMB) precedentemente ricostituito e rivitalizzato in AOBE e isolato in purezza in piastre di Anacker Ordal Agar Enriched (AOAE).

Ogni 24 ore, per 7 giorni, da ciascuna delle tre provette sono stati prelevati 2,5 ml per la lettura della densità ottica (O.D.) mediante spettrofotometro (Pharmacia Biotech Ultraspec® 3000) ad una lunghezza d'onda pari a 550 nm. Ogni valore è stato registrato come media di 10 misurazioni. Dal valore di O.D. così ottenuto è stata ricavata la concentrazione batterica attraverso la proporzione:

$$0,125 : (150 \times 10^6) = OD : X$$

dove 0,125 è la densità ottica ottenuta a 550 nm dalla soluzione 0,5 della scala Mac Farland avente titolo di circa 150×10^6 batteri/ml e X è la concentrazione batterica (batteri/ml) ricercata.

Caratteristiche culturali/biochimiche	Risultato atteso
Morfologia colonie su AOAE a 48/72 ore (esame macroscopico)	Opache, gialle, circolari, convesse, lisce, con margine intero (talvolta sciamanti), brillanti
Morfologia colonie a 48/72 ore (stereomicroscopio 100x)	Idem con riflessi bluastri, evidente l'eventuale margine non regolare
Mobilità e morfologia (colonia prelevata da AOAE) a 48/72 ore, 400x in contrasto di fase	<i>Gliding motility</i> (debole), stretti, media lunghezza
Mobilità e morfologia (goccia da AOBE) a 48/72 ore, 400x in contrasto di fase	<i>Gliding motility</i> (di solito più vivace), più lunghi e stretti
Gram	Negativo
Morfologia 1000x	Rosa, lunghi e stretti (più corti se la colonia è vecchia)
Ossidasi	Positiva (debole)
Catalasi	Positiva (debole)
Crescita continua su agar sangue per 8 gg	Negativa
Crescita in AOBE + 0% NaCl a 10 gg	Positiva
Crescita in AOBE + 0,5% NaCl a 10 gg	Positiva
Crescita in AOBE + 1% NaCl a 10 gg	Negativa
Crescita in AOBE a 4-5° C a 10 gg	Positiva
Crescita in AOBE a 15-17° C a 10 gg	Positiva
Crescita in AOBE a 25° C a 10 gg	Negativa
Assorbimento sol. 0,01% di rosso Congo su colonie di 48/72 ore	Negativo
Produzione di flexirubina su colonie di 48/72 ore	Positiva
Fermentazione/degradazione	
Amido (lettura a 8/10 gg)	Negativo
Caseina (lettura a 8/10 gg)	Positivo
Glucosio (lettura a 8/10 gg)	Negativo
H ₂ S (lettura a 10 gg) con cartine al 10%	Positivo
Nitrati (lettura a 10 gg)	Negativo
Tiroxina (lettura a 8/10 gg)	Variabile
Produzione pigmento dall'idrolisi della tirosina (lettura a 8/10 gg)	Positivo
API 50 CH	Tutti i pozzetti negativi (assenza di utilizzo degli zuccheri)

Tabella 1 – Prove di identificazione fenotipica per *Flavobacterium psychrophilum*.
Table 1 - *Flavobacterium psychrophilum* phenotypical characteristics.

Prove d'infezione sperimentale -Prima prova intraperitoneale

Da una soluzione contenente $1,38 \times 10^8$ batteri/ml del ceppo di campo 53/03 sono state preparate 4 diluizioni 1:10 (10^2 , 10^3 , 10^4 e 10^5 batteri/ml) con cui sono stati infettati quattro gruppi di 20 avannotti ciascuno di trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*) di 2 g. Previa anestesia per bagno con MS222 (tricaina metansulfonato) al dosaggio di 30 ppm per 2-3 minuti, sono stati iniettati, tramite siringa automatica, 0,1 ml di ciascuna diluizione per via intraperitoneale ottenendo una dose finale di 10 , 10^2 , 10^3 e 10^4 batteri/pesce rispettivamente per il gruppo 1, 2, 3 e 4. Come controllo sono stati iniettati 0,1 ml di soluzione fisiologica sterile nei soggetti del gruppo 5.

Per 30 giorni è stata registrata la mortalità in ogni singola vasca e da ciascun soggetto è stato effettuato l'esame batteriologico mediante semina dalla milza direttamente in AOB, incubato a 15°C per 15 gg.

Prima prova per bagno

Nuovi soggetti di 3 g. sono stati stabulati in 10 vasche, in ragione di 80 per vasca, in modo tale da costituire 5 gruppi in doppio (A1-A5 e B1-B5). Durante il periodo di adattamento di tre settimane, abbiamo registrato una minima mortalità che ha modificato il numero di soggetti per la sperimentazione, come segue: A1 80 soggetti, A2 75, A3 80, A4 78, A5 78, B1 79, B2 78, B3 78, B4 78, B5 78.

Le colture batteriche usate per l'infezione consistevano in tre bottiglie da 1 litro caduna di AOB precedentemente innestate con 5 ml di AOB contenente il ceppo *F. psychrophilum* di referenza (1947 NCIMB) con titolo $1,12 \times 10^9$ batteri/ml e aventi a loro volta un titolo finale dell'ordine di 10^8 batteri/ml ciascuna. Bloccando il flusso idrico, il livello dell'acqua è stato abbassato fino ad un volume pari a 10 litri/vasca e la sospensione infettante è stata aggiunta in modo tale da ottenere le seguenti concentrazioni batteriche espresse in batteri/ml:

10^7 in A1 e B1;

10^6 in A2 e B2;

10^5 in A3 e B3;

10^4 in A4 e B4;

100 ml/vasca di soluzione fisiologica sterile in A5 e B5 come controlli.

I pesci sono rimasti a contatto con la soluzione infettante per 30 minuti, in presenza di ossigenazione supplementare mediante l'utilizzo di pietre porose; successivamente è stato ripristinato il flusso idrico a circuito aperto. Gli animali sono rimasti in osservazione per 30 giorni e su tutti i soggetti rinvenuti morti, data la notevole indaginosità dell'isolamento culturale e della tipizzazione biochimica, sono state eseguite delle impronte dalla milza su vetrino e successiva colorazione con fucsina, per verificare la presenza di batteri filamentosi Gram negativi al microscopio ottico (Sarti *et al.*, 1992).

Seconda prova per bagno

Questa prova è stata eseguita secondo le stesse modalità della precedente ad eccezione del ceppo batterico usato, che in questo caso era il ceppo di campo 53/03.

Seconda prova intraperitoneale

Una seconda prova è stata eseguita, con modalità analoghe alla prima prova intraperitoneale, ma a distanza di quasi un anno, con lo stesso ceppo di campo 53/03 su cinque gruppi di 30 avannotti di trota iridea (*O. mykiss*) di circa 2 g. in doppio (dieci vasche in totale). Le concentrazioni delle soluzioni iniettate ai soggetti dei vari gruppi erano rispettivamente 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 batteri/pesce, mentre un quinto gruppo fungeva da controllo. L'osservazione degli animali è durata 30 giorni: su tutti i soggetti rinvenuti morti

sono state eseguite delle impronte della milza su vetrino e successiva colorazione con fucsina per verificare la presenza di batteri filamentosi al microscopio ottico (Sarti *et al.*, 1992).

Analisi statistica

I dati ottenuti nelle prove d'infezione sperimentale sono stati analizzati mediante il Test F, utilizzando il programma R-Project, ponendo $\alpha^{\text{teorico}} = 0,01$ come livello di accettazione.

RISULTATI

Crescita microbica nei diversi terreni -

I risultati dello studio sulla crescita microbica nei diversi terreni sono riportati nei Grafici 1, 2 e 3. Confrontando i risultati ottenuti circa la velocità di crescita del microrganismo, è stato scelto il terreno AOB dato il minor costo e il soddisfacente titolo di O.D. raggiunto.

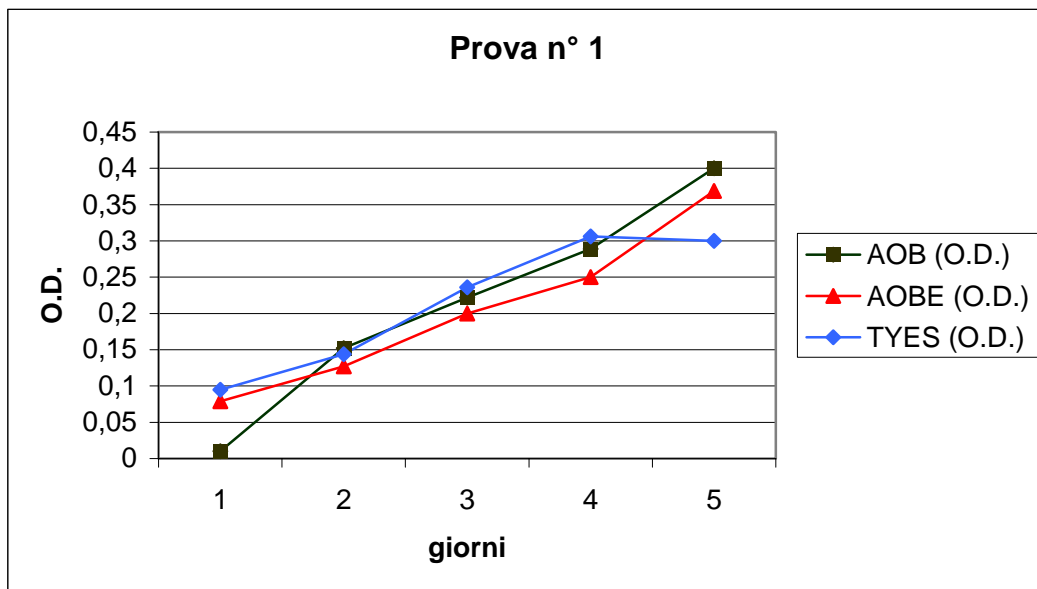


Grafico 1 – Crescita di *Flavobacterium psychrophilum* in differenti terreni liquidi.
 Graphic 1 – *Flavobacterium psychrophilum* growth in different liquid medium.

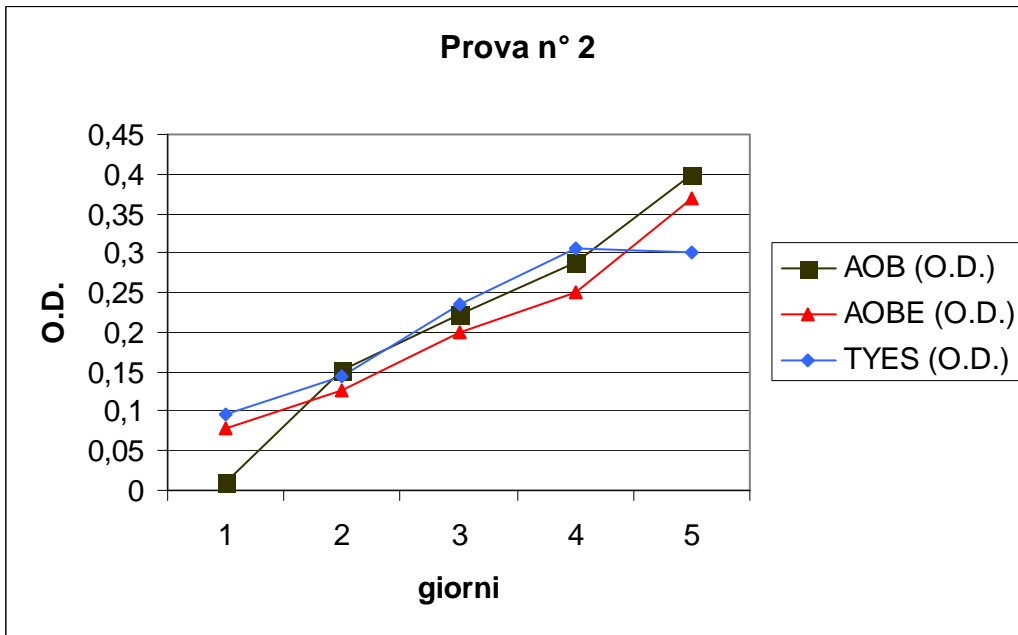


Grafico 2 – Crescita di *Flavobacterium psychrophilum* in differenti terreni liquidi.
Graphic 2 – *Flavobacterium psychrophilum* growth in different liquid medium.

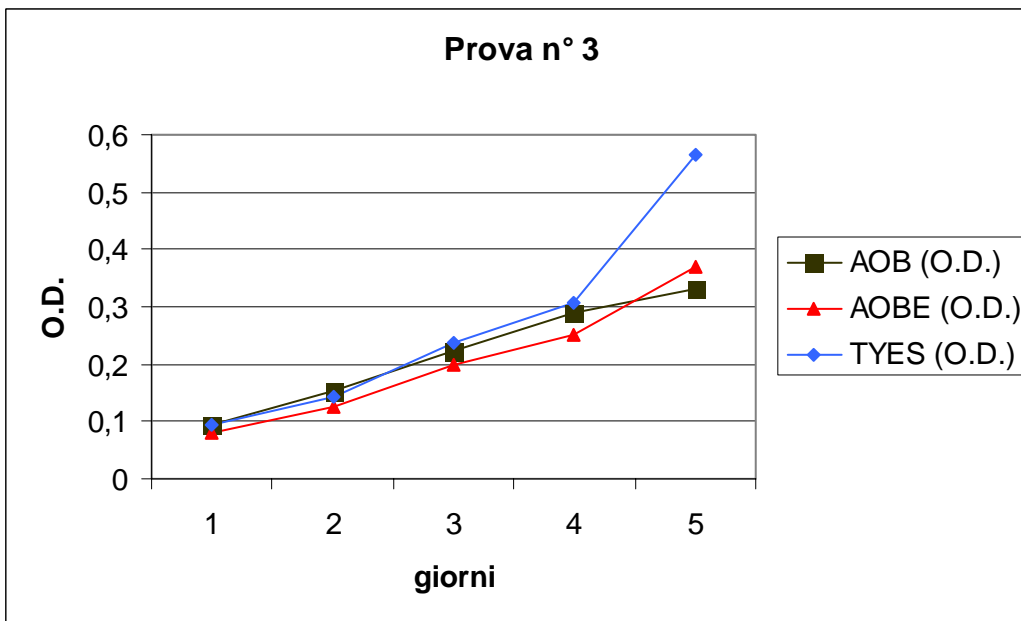


Grafico 3 – Crescita di *Flavobacterium psychrophilum* in differenti terreni liquidi.
Graphic 3 – *Flavobacterium psychrophilum* growth in different liquid medium.

Prima prova intraperitoneale -

I risultati sono riportati nella Tabella 1 e nel Grafico 4. Le dosi infettanti 10^4 , 10^3 , 10^2 e 10^1 batteri/pesce hanno determinato rispettivamente mortalità di 0%, 20%, 30% e 50%. All'osservazione anatomopatologica le lesioni più frequenti sono state riscontrate a carico di cuore, rene, milza e branchie, a livello dei quali sono stati osservati anemia di grado variabile. Spesso è stata riscontrata splenomegalia ed emorragie puntiformi a carico della stessa milza e delle branchie. Queste ultime, all'osservazione a fresco con microscopio ottico, evidenziavano lamelle secondarie ispessite con presenza di batteri di forma allungata dal caratteristico movimento reptante (gliding bacteria). In tutti i soggetti si è riusciti a isolare flavobatteri in purezza e a tipizzarli correttamente.

Dose infettante batteri/pesce	Date registrazione mortalità											Mortalità	
	16/03	29/03	31/03	01/04	03/04	05/04	06/04	09/04	13/04	14/04	19/04		
10^4		X	X	X	X	XX	X		X		XX	10/20	50%
10^3	X	XX		X				XX				6/20	30%
10^2		X				X				X	X	4/20	20%
10												0/20	0%
Controllo												0/20	0%

Tabella 1 – Risultati della prima prova d'infezione intraperitoneale.
 Table 1 – First i.p. challenge results.

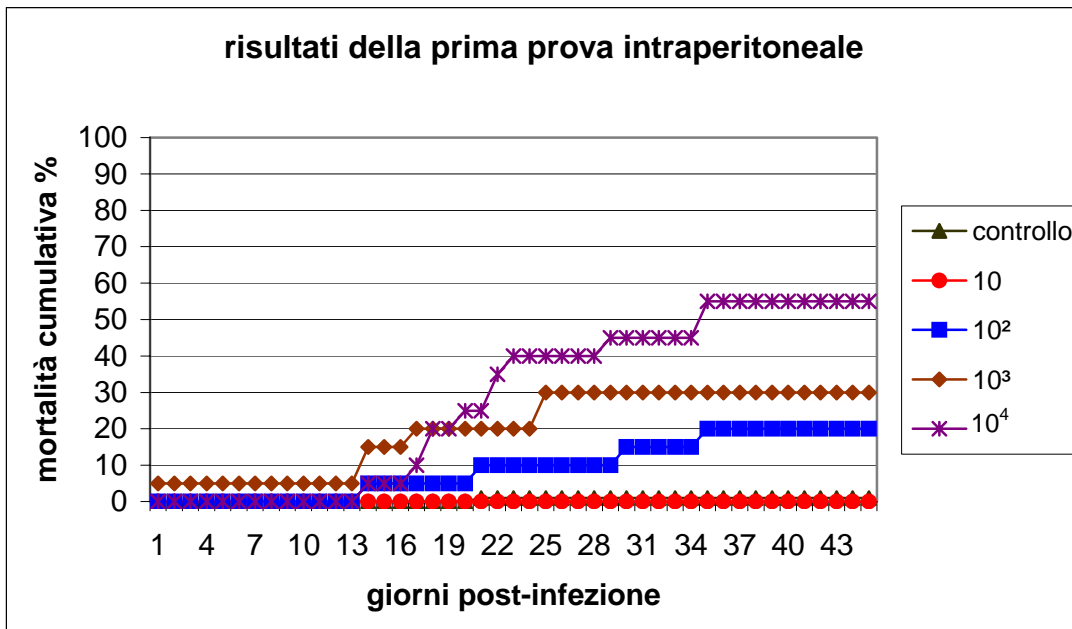


Grafico 4 – Risultati della prima prova d'infezione intraperitoneale.
 Graphic 4 – First i.p. challenge results.

Risultati della prima prova di infezione per bagno, effettuata utilizzando il ceppo di referenza 1947 NCIMB -

I risultati sono riportati nella Tabella 2. Dai soggetti morti è stato possibile evidenziare la presenza di batteri filamentosi a livello di impronta splenica.

Gruppi	Dose infettante batteri/ml	Date registrazione mortalità								Mortalità	
		27/05	28/05	03/06	07/06	08/06	14/06	15/06	21/06		
A1	10 ⁷				X			X	X	3/80	3,75%
A2	10 ⁶									0/75	0%
A3	10 ⁵									0/80	0%
A4	10 ⁴			X				X		2/78	2,56%
A5	Controllo								X	1/78	1,28%
B1	10 ⁷	X	X							2/79	2,53%
B2	10 ⁶									0/78	0%
B3	10 ⁵				X		X		X	3/78	3,85%
B4	10 ⁴					X			X	2/78	2,56%
B5	Controllo	X			X	X			X	4/78	5,13%

Tabella 2 – Risultati della prima prova d'infezione per bagno.
Table 2 – First bath challenge results.

Risultati della seconda prova di infezione per bagno, effettuata utilizzando il ceppo di campo 53/03 -

I risultati sono riportati in Tabella 3. Dai soggetti morti non è stato possibile evidenziare la presenza di batteri filamentosi a livello di impronta splenica. Questa prova è stata eseguita con modalità analoghe alla precedente, optando per il ceppo di campo dati i risultati ottenuti con la prima prova intraperitoneale.

Seconda prova intraperitoneale -

Sono state aumentate di un esponente le dosi rispetto alla prima prova intraperitoneale, dati i risultati ottenuti. I risultati sono riportati in Tabella 4. Dai soggetti morti non è stato possibile evidenziare la presenza di batteri filamentosi a livello di impronta splenica.

Gruppi	Dose infettante batteri/ml	Date registrazione mortalità								Mortalità	
		22/06	23/06	25/06	28/06	01/07	05/07	07/07	12/07		
A1	10 ⁷		X				X			2/80	2,5%
A2	10 ⁶									0/80	0%
A3	10 ⁵									0/80	0%
A4	10 ⁴			XX		X		XX	X	6/80	7,5%
A5	Controllo									0/80	0%
B1	10 ⁷	X							X	2/80	2,5%
B2	10 ⁶	X							X	2/80	2,5%
B3	10 ⁵				X					1/80	1,25%
B4	10 ⁴	X	X						X	3/80	3,75%
B5	Controllo						X			1/80	1,25%

Tabella 3 – Risultati della seconda prova d'infezione per bagno.
Table 3 – Second bath challenge results.

Gruppi	Dose infettante batteri/pesce	Date registrazione mortalità					Mortalità	
		19/07	21/07	26/07	05/08	18/08		
A1	10 ⁵	X				X	2/30	6,66%
A2	10 ⁴			X			1/30	3,33%
A3	10 ³						0/30	0%
A4	10 ²						0/30	0%
A5	Controllo A		X				1/30	3,33%
B1	10 ⁵						0/30	0%
B2	10 ⁴						0/30	0%
B3	10 ³				X		1/30	3,33%
B4	10 ²						0/30	0%
B5	Controllo B			X			1/30	3,33%

Tabella 4 – Risultati della seconda prova d'infezione intraperitoneale.
Table 4 – Second i.p. challenge results.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Nella prima prova intraperitoneale esiste una proporzionalità diretta tra la dose infettante e la percentuale cumulativa di mortalità per ogni gruppo. Utilizzando il Test F i dati ottenuti sono infatti risultati significativi, con $\alpha^{\text{osservato}} < \alpha^{\text{teorico}}$ ($\alpha^{\text{teorico}}=0,01$). La dose di 10^4 batteri/pesce potrebbe essere valutata come dose letale 50 del ceppo di campo 53/03 di *F. psychrophilum*.

Viceversa, nelle prove per bagno la mortalità in tutti i gruppi è stata sporadica e non correlabile statisticamente con le dosi somministrate. Numerosi articoli in letteratura descrivono gli insuccessi nelle prove di infezione sperimentale per bagno: alcuni autori riportano risultati significativi, ma non riproducibili, altri ancora sottolineano che in assenza di scarificazione cutanea non è stata registrata alcuna mortalità (Nordmo, 1997; Madsen & Dalsgaard, 1999; Decostere *et al.*, 2000; Garcia *et al.*, 2000; Madetoja *et al.*, 2000). Anche se le concentrazioni batteriche sono controllate meticolosamente, la penetrazione del microrganismo nell'ospite rappresenta un complesso meccanismo ed è praticamente impossibile stabilire il numero di batteri che raggiungono la superficie del soggetto (Garcia *et al.*, 2000). Infezione per bagno e "cohabitation challenge" (soggetti infettati per via i.p. stabulati con soggetti sani) rappresentano i metodi che mimano il più fedelmente possibile l'esposizione naturale del soggetto al patogeno, permettendo ai meccanismi di difesa specifici e non-specifici della cute di svolgere la loro funzione (Nordmo, 1997): se da un lato è possibile che in allevamento dei soggetti possano contrarre la patologia in seguito a soluzioni di continuo della cute per traumatismi o contatti con sostanze irritanti, dall'altro ciò non giustificherebbe la così elevata mortalità nelle avannotterie (Madetoja *et al.*, 2000). Si è ritenuto quindi opportuno non traumatizzare la cute dei soggetti, sia perché risultava molto difficile scarificare in ugual misura 800 esemplari, sia per non offrire al patogeno una porta già aperta d'infezione. Non si può inoltre escludere che il ceppo 1947 NCIMB fosse dotato di scarsa patogenicità, magari correlabile a lunghi periodi di stoccaggio a -80°C , né che il ceppo 53/03, rivelatosi in precedenza virulento per via intraperitoneale, possa palesare, se somministrato nel mezzo acquoso, una patogenicità insufficiente a superare le barriere difensive del pesce. Un'ulteriore spiegazione scaturisce dalla considerazione che il numero dei linfociti negli organi ematopoietici e quindi il grado di immunocompetenza varia in base soprattutto alle dimensioni dei pesci: soggetti di peso inferiore ai 2 grammi non sono ancora dotati di un sistema immunitario completo (Nordmo, 1997; Madsen & Dalsgaard, 1999; Decostere *et al.*, 2000). A causa della scarsa disponibilità di avannotti Flavobatteriosi-free, sono stati utilizzati, in entrambe le prove d'infezione per bagno, soggetti del peso di 3 grammi: questi possiedono un sistema immunitario piuttosto sviluppato e ciò potrebbe in parte motivare l'insuccesso delle prove eseguite e giustificare i risultati ottenuti in letteratura con soggetti di 0,5-1,5 grammi (Decostere *et al.*, 2000; Madetoja *et al.*, 2000).

La seconda ed ultima prova per via parenterale, a distanza di circa otto mesi dalla prima, è stata eseguita utilizzando il ceppo di campo 53/03. Il diverso stato immunitario dei soggetti e l'attenuazione del ceppo durante lo stoccaggio potrebbero, anche in questo caso, spiegare i risultati registrati. La differenza di patogenicità tra le due prove i.p. potrebbe infatti essere dovuta al fatto che nella prima infezione è stato utilizzato il ceppo 53/03 isolato poche settimane prima da avannotti di trota iridea nell'ambito di un episodio di malattia conclamata, mentre nel secondo caso il ceppo è stato rivitalizzato a distanza di oltre 8 mesi.

Le prove di infezione sperimentale eseguite hanno dunque confermato le difficoltà riportate in letteratura da diversi autori e che non esistono ancora dei validi protocolli d'infezione, soprattutto nelle prove per bagno. Tali difficoltà rispecchiano la mancanza di dati sull'iter patogenetico della malattia e, a loro volta, causano grandi difficoltà nella valutazione dell'efficacia dei vaccini. Si renderanno pertanto necessari sia

l'approfondimento, tramite prove per bagno e coabitazione, dei meccanismi di interazione tra patogeno, ospite ed ambiente, sia l'esecuzione di nuovi test d'infezione con animali di 1-2 g. e con ceppi batterici adeguatamente rivirulentati.

BIBLIOGRAFIA

- Austin B. & Austin D.A. (1999). Bacterial fish pathogens. Disease of farmed and wild fish. 3rd Ed. Praxis Publishing, Chichester, England: 97-99.
- Decostere A., Lammens M. & Haesebrouck F. (2000). Difficulties in experimental infections studies with *Flavobacterium psychrophilum* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using immersion, oral and anal challenges. *Res. Vet. Sci.*, 69: 165-169.
- Garcia C., Pozet F. & Michel C. (2000). Standardisation of experimental infection with *Flavobacterium psychrophilum*, the agent of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* fry syndrome. *Dis. Aquat. Org.*, 42: 191-197.
- Ghittino C. & Pedroni A. (2001). Main bacterial pathologies in salmonid fish: diagnosis, therapy and prevention. In: Baruchelli (ed.), *Modern Trout Farming, ESAT News*, 17, 4 supplement: 41-56.
- Ghittino P. (1985). Tecnologia e patologia in acquacoltura. *Tipografia E. Bono, Torino*: 119-134.
- Inglis V., Roberts R.J. & Bromage N.R. (1993). Bacterial diseases of fish. *Blackwell Scientific Publications, Oxford, Great Britain*: 74-77.
- Madetoja J., Nyman P. & Wiklund T. (2000). *Flavobacterium psychrophilum*, invasion into and shedding by rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Dis. Aquat. Org.*, 43: 27-38.
- Madsen L. & Dalsgaard I. (1999). Reproducible methods for experimental infection with *Flavobacterium psychrophilum* in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Dis. Aquat. Org.*, 36: 169-176.
- Nordmo R. (1997). Strengths and weaknesses of different challenge methods. *Fish Vaccinol.*, 90: 303-309.
- Sarti M., Giorgetti G. & Manfrin A. (1992). Method for rapid diagnosis of visceral myxobacteriosis in reared trout in Italy. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 12, 2: 53.