

## Prove di vaccinazione della spigola (*Dicentrarchus labrax*) contro la Pasteurellosi mediante somministrazione orale, intraperitoneale e per immersione

A. Paolini<sup>1</sup>, V. Ridolfi<sup>1</sup>, D. Zezza<sup>1</sup>, M. Cocchietto<sup>2</sup>, M. Musa<sup>1</sup>  
A. Pavone<sup>1</sup>, A. Conte<sup>1</sup> & G. Giorgetti<sup>1</sup>

### Riassunto

*Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (Phdp) è l'agente eziologico della Pasteurellosi ittica, responsabile di gravi perdite negli impianti di acquacoltura intensivi. Nel presente lavoro è stata comparata l'efficacia protettiva di 5 differenti forme vaccinali: orale, intraperitoneale, immersione, immersione bivalente (*Vibrio anguillarum*), immersione con immunostimolante. Ognuna di queste forme vaccinali, contenenti cellule intere di Phdp inattivate con formalina (FKC), è stata somministrata a 100 spigole di 2 g circa; 100 spigole non vaccinate sono state utilizzate come controllo. A 40 giorni dalla vaccinazione è stata effettuata l'infezione sperimentale mediante inoculo intraperitoneale di una sospensione batterica di Phdp alla concentrazione di  $2,75 \times 10^4$  UFC/ml. La mortalità è stata registrata per i 14 giorni successivi. La protezione vaccinale è stata valutata utilizzando l'indice di sopravvivenza, Relative Percentage Survival (RPS): la formulazione intraperitoneale ha conferito un'ottima protezione (RPS 82,4%); nei gruppi vaccinati per immersione il risultato migliore (RPS 26,4%) è stato ottenuto dal gruppo cui è stato somministrato l'immunostimolante, seguito dalla immersione semplice (RPS 23,1%) e infine dal gruppo che era stato vaccinato con il vaccino bivalente (RPS 18,7%); la protezione conferita dalla formulazione orale (RPS 28,6%) risulta interessante in

considerazione anche della utilità pratica di questa via di somministrazione.

### Parole chiave

Pasteurellosi Ittica - *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* - Vaccino.

### Introduzione

La pasteurellosi ittica è una malattia di origine batterica a carattere setticemico. L'agente eziologico è *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (Phdp), un coccobacillo gram negativo, con colorazione bipolare, asporigeno, aerobio-anaerobio facoltativo (8).

Questa patologia, a partire dagli anni '60, ha causato ingenti perdite produttive negli allevamenti sia del Giappone che degli Stati Uniti d'America; in Europa i primi focolai sono stati segnalati negli anni '90 (4). Colpisce tutte le specie ittiche eurialine, sia selvatiche che allevate, causando pesanti mortalità soprattutto negli allevamenti intensivi e nei soggetti più giovani.

L'elevato impatto economico di questa malattia ha reso indifferibile la necessità di una strategia di controllo, sempre più indirizzata verso la profilassi vaccinale. L'uso frequente di chemioterapici infatti ha determinato fenomeni di farmacoresistenza e problematiche connesse ai residui nell'ambiente; inoltre le costose terapie antibiotiche non sempre risultano efficaci a causa dell'inappetenza dei soggetti colpiti e del limitato numero di farmaci autorizzati.

In questo lavoro sono state effettuate delle prove

<sup>1</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo & del Molise «G. Caporale» (IZSA&M), Teramo - Italia

<sup>2</sup>Fondazione Callerio, Istituti di Ricerche Biologiche, Trieste - Italia

di vaccinazione contro la pasteurellosi utilizzando diverse vie e forme di somministrazione al fine di compararne l'efficacia protettiva.

## Materiali e metodi

### Ceppo batterico

Per la preparazione del vaccino è stato utilizzato il ceppo di campo Phdp 249/199, isolato in Italia da spigola durante un'epidemia naturale di pasteurellosi nell'estate 1999 (IZS delle Venezie). L'isolato primario è stato conservato in cryobeads a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Per l'infezione sperimentale è stato utilizzato lo stesso ceppo Phdp 249/199, rivirulentato mediante quattro passaggi in vivo su spigola.

### Pesci e impianto

Per le prove sperimentali sono state utilizzate spigole (*Dicentrarchus labrax*) del peso di 2-2,5 g, stabulate nell'impianto situato nella sede di Torre Cerrano dell'Istituto Zooprofilattico dell'Abruzzo & del Molise. L'impianto, a ciclo aperto, è costituito da 12 vasche coibentate cilindriche da 100 litri, alimentate con acqua di mare filtrata da filtri a cartuccia da 25, 10 e 1  $\mu\text{m}$ .

I pesci sono stati acclimatati per 2 settimane prima dell'inizio della sperimentazione.

Ogni vasca, munita di aeratore interno, ha ricevuto nelle ore diurne un flusso d'acqua di 0,25 l/min. I livelli di ossigeno, temperatura e nitriti sono stati monitorati due volte al giorno; la temperatura dell'acqua, non condizionata, ha registrato un valore medio di  $23,4^{\circ}\text{C}$  (min  $19,9^{\circ}\text{C}$ ; max  $25,8^{\circ}\text{C}$ ), mentre la concentrazione media dell'ossigeno è stata di 5,6 ppm (min 5,1 ppm; max 6,5 ppm).

I pesci sono stati alimentati due volte al giorno con mangime di tipo commerciale in pellet somministrato in quantità pari al 3% del peso vivo/giorno. L'alimentazione è stata sospesa il giorno antecedente la vaccinazione e l'infezione sperimentale.

Il peso medio delle spigole alla fine della sperimentazione era di 10 g.

### Preparazione del vaccino

Per la preparazione dell'antigene vaccinale, costituito da cellule intere di Phdp inattivate con formalina (FKC) è stato seguito il seguente protocollo: il ceppo di campo è stato coltivato in Tryptone Soya Broth (TSB, Oxoid) al 2% NaCl alla temperatura di  $25^{\circ}\text{C}$ , monitorando la crescita mediante lettura spettrofotometrica a 610 nm fino al raggiungimento del valore di densità ottica  $A_{610\text{nm}}=0,8$ , densità stimata corrispondere, in base a prove effettuate in precedenza, ad una concentrazione di circa  $1 \times 10^8$  UFC/ml. La coltura è stata quindi inattivata mediante aggiunta di aldeide formica alla concentrazione finale di 0,5% v/v, lasciata in agitazione magnetica per circa 3 ore a temperatura ambiente e poi overnight a  $4^{\circ}\text{C}$ .

La coltura è stata in seguito centrifugata a 12304 x g per 30 minuti a  $4^{\circ}\text{C}$  con apparecchio SORVALLRC 5C PLUS raccogliendo il pellet dopo due lavaggi in PBS (pH  $7,4 \pm 0,2$ ).

Il numero di batteri presenti nella soluzione vaccinale è stato determinato mediante conta su piastra delle unità formanti colonia effettuando diluizioni scalari in base 10 a partire da 100 ml della brodocoltura pre-inattivazione e seminando per spatolamento, su piastre di terreno Tryptone Soya Agar (TSA Oxoid) al 2% NaCl, un inoculo di 50 ml.

### Vaccino orale

Le FKC, prodotte come descritto in precedenza, sono state liofilizzate (peso finale 850 mg) e microincapsulate in microsfele di alginato di calcio rivestite da chitosano ottenendo una quantità complessiva di 9,5 g di microincapsulato contenente  $2,14 \times 10^{10}$  FKC.

Le microsfele (MSs) sono state preparate secondo le procedure descritte nel WO 2005/013941 (Brevetto

Internazionale) con la tecnica dell'emulsione con 4% w/v di alginato (Protan-Biopolymers, Drammen, Norway), 0,1% w/v chitosano CL 213 (Pronova Biomedical, Oslo, Norway), 15% w/v  $\text{CaCl}_2$ , 20% w/w lisozima (LZ) (hen-egg white lysozyme chloride, SPA Milan, Italy) e 10% w/w di FKC di PhdP. La forma, il diametro medio e il grado di rigonfiamento sono stati determinati attraverso una tecnica di analisi delle immagini con microscopio luminoso (Olympus BH-2, GMI, Inc., Ramsey, MN, USA), dotato di una macchina fotografica (CCD Camera ICD-42E; Ikegami Tsushinki Co., Japan) per mezzo di appositi software (Optomax V Software, Cambridge, MA, USA). In tutte le misurazioni sono state esaminate almeno 3000 particelle. Il potenziale Z (parametro che influenza sia la stabilità delle particelle che la loro mucoadesività) è stato determinato mediante spettroscopia per correlazione fotonica (Zetasizer 3000 HSA, Malvern Instruments). L'efficienza di incapsulazione degli antigeni Phdp è stata determinata mediante tecnica fluorimetrica dopo marcatura con isotiocianato di fluorescina (FITC). L'analisi dell'immagine ha mostrato che le MSs hanno una forma approssimativamente sferica, con un diametro e grado di rigonfiamento di  $2.9 \pm 1.1 \mu\text{m}$  e  $3.5 \pm 1.4 \mu\text{m}$ , rispettivamente. Il potenziale Z è stato del  $2.1 \pm 0.5$  mentre l'efficienza di incapsulazione di Phdp è stata del 40%.

#### ***Vaccino per immersione***

Il pellet di FKC è stato risospeso in 500 ml di PBS, ottenendo una concentrazione finale di  $1 \times 10^9$  UFC/ml, somministrata come descritto di seguito.

#### ***Vaccino intraperitoneale***

La formulazione intraperitoneale era costituita da una miscela di FKC e prodotti extracellulari (ECP). Gli ECP sono stati ottenuti raccogliendo il surnatante dalla centrifugazione a  $12304 \times g$  per 30 minuti a  $4^\circ\text{C}$  della coltura batterica inattivata

con formalina 0,5%, sterilizzato per filtrazione mediante membrane con pori del diametro di  $0,45 \mu\text{m}$  (Millipore); la formalina è stata poi neutralizzata con l'aggiunta di una soluzione di sodiometa-bisolfito al 15% in quantità di 10 ml/l di surnatante, incubando overnight a temperatura ambiente.

È stata effettuata una stima degli ECP presenti nel surnatante, quantificando le proteine secondo il metodo Bradford (3), utilizzando come proteine standard concentrazioni scalari di siero albumina bovina (Sigma, St Louis, USA).

La miscela conteneva  $7,57 \times 10^7$  FKC/ml e  $0,035 \mu\text{g}$  proteine/ml. Per completare la preparazione vaccinale è stato aggiunto l'adiuvante (Montanide, Seppic) in rapporto 30:70.

#### ***Somministrazione del vaccino***

La vaccinazione è stata effettuata a 10 gruppi di 50 spigole, 2 gruppi di 50 spigole non vaccinate sono stati utilizzati come controllo. Ognuna delle 5 differenti forme vaccinali (orale, intraperitoneale, immersione, immersione bivalente, immersione/immunostimolante) è stata quindi somministrata a 100 spigole.

#### ***Vaccinazione orale***

Il vaccino orale è stato somministrato con l'alimento in quantità di 8,6 mg MS/pesce/die, per 5 giorni consecutivi seguiti da una pausa di cinque giorni e poi da una successiva somministrazione per altri 5 giorni consecutivi. Ogni pesce ha ricevuto complessivamente  $1,8 \times 10^9$  FKC.

#### ***Vaccinazione per immersione***

Sono state preparate due formulazioni vaccinali per immersione:

##### ***1) Immersione monovalente***

La sospensione di FKC in PBS precedentemente descritta è stata diluita 1:10 in acqua di mare, alla concentrazione finale di  $1 \times 10^8$  UFC/ml. È stata somministrata a 2 gruppi di 100 spigole, uno dei quali ha ricevuto anche immunostimolante

commerciale a base di estratti di alghe (Ergosan Schering-Plough), somministrato per via orale, in ragione del 0,5% del mangime, per 14 giorni non consecutivi.

## 2) Immersione bivalente (Phdp + *Vibrio anguillarum*)

La sospensione di FKC di Phdp è stata miscelata in parti uguali con un vaccino commerciale anti-*Vibrio anguillarum* (Schering-Plough). Questa miscela è stata diluita 1:10 in acqua di mare, la soluzione vaccinale così ottenuta conteneva  $5 \times 10^7$  FKC Phdp/ml +  $5 \times 10^7$  FKC *Vibrio anguillarum*/ml; I pesci sono stati immersi per 60 minuti in dette formulazioni vaccinali, con un rapporto 6 pesci/litro di vaccino e in condizioni di aerazione costante, poi sono stati passati in acqua marina pulita per rimuovere le particelle batteriche non adese e trasferiti nelle vasche di stabulazione.

## Vaccinazione intraperitoneale

I pesci, previamente anestetizzati per bagno con MS-222 (Sigma, St. Louis, USA) diluito in acqua di mare alla concentrazione di 5ppm, sono stati inoculati intraperitoneo con 50  $\mu$ l della miscela precedentemente descritta; ogni pesce ha ricevuto  $3,79 \times 10^6$  FKC e 0,00177  $\mu$ g di ECP.

## Valutazione della protezione vaccinale

Quaranta giorni dopo la vaccinazione, i gruppi vaccinati ed i controlli sono stati sottoposti ad infezione sperimentale al fine di valutare la protezione conferita dalle diverse tipologie vaccinali. L'infezione sperimentale è stata condotta mediante inoculo intraperitoneale di 100  $\mu$ l di soluzione in PBS sterile di cellule batteriche Phdp alla concentrazione di  $2,75 \times 10^4$  ufc/ml.

È stato utilizzato il ceppo di campo 249/I99 rivirulentato mediante quattro passaggi in vivo su spigola: una spigola è stata inoculata con 100  $\mu$ l di una sospensione batterica di Phdp 249/I99 in TSB al 2% di NaCl a concentrazione  $1,78 \times 10^8$  UFC/ml diluita 1:10 in PBS; alla morte del pesce,

ne è stata prelevata sterilmente la milza, posta in una piastra Petri, omogeneizzata con PBS e pestellata; 100  $\mu$ l di tale omogenato sono stati inoculati intraperitoneo in una seconda spigola; alla morte di questa, è stato effettuato un uguale passaggio di rivirulentazione dalla milza in un terzo pesce e poi in un quarto; alla morte dell'ultimo pesce, ne è stata prelevata sterilmente la milza, omogeneizzata con PBS sterile, seminata con un'ansa su una piastra di agar sangue al 2% di NaCl ed incubata a 25 °C; le colonie di Phdp isolate in purezza sono state conservate in cryobeads a -20 °C fino al momento dell'infezione sperimentale, quando una microbead del ceppo rivirulentato è stata aggiunta in 10 ml di TSB al 2% di NaCl ed incubata 25°C; dopo 28 ore, al raggiungimento del valore di D.O.  $A_{610nm}=1$ , corrispondente alla concentrazione di  $3,6 \times 10^8$  UFC/ml, determinata mediante conta in piastra su TSA al 2% NaCl, la coltura è stata diluita 1:10000 in PBS.

La mortalità è osservata per quattordici giorni successivi all'infezione sperimentale.

La protezione vaccinale è stata valutata utilizzando l'indice di sopravvivenza, Relative Percentage Survival (RPS), calcolato come descritto da Amend (1):

$RPS = [1 - (\% \text{ mortalità vaccinati} / \% \text{ mortalità non vaccinati})] \times 100$ .

Per valutare la significatività delle differenze tra la mortalità osservata nei gruppi vaccinati e nei controlli, per ogni gruppo è stata calcolata la distribuzione di mortalità complessiva mediante approccio Bayesiano utilizzando la distribuzione Beta (s+1; n-s+1) dove s= numero di esemplari morti e n= numero totale di esemplari in sperimentazione. Per ogni distribuzione sono stati calcolati gli intervalli di confidenza al 95%.

## Risultati

Phdp è stato isolato da spigole di tutti i gruppi infettati mediante semina dalla milza e dal rene

anteriore su agar sangue al 2% di NaCl; l'identificazione è stata confermata mediante sieroaagglutinazione con specifico antisiero (siero anti Ig di spigola prodotto su coniglio, IZS delle Venezie) e identificazione biochimica (API 20E Biomerieux).

La mortalità seguita all'infezione sperimentale è iniziata 48 ore dopo l'inoculo e si è conclusa al dodicesimo giorno (Figura 1).

La mortalità dei controlli a 14 giorni dall'infezione sperimentale è stata del 91%.

La mortalità media delle spigole vaccinate è stata del 58,4%, a cui corrisponde un RPS di 35,84%.

La mortalità dei gruppi vaccinati per immersione semplice, immersione bivalente e immersione con immunostimolante, è stata rispettivamente del 70%, del 74% e del 67% (Tabella I); i relativi RPS sono pari al 23,1%, 18,7% e 26,4%.

La mortalità del gruppo vaccinato per via

intraperitoneale è stata del 16%, risultando un RPS pari all'82,4%, mentre la mortalità del gruppo sottoposto a vaccinazione orale è stata del 65% con RPS pari al 28,6%.

La mortalità nei controlli ha mostrato una differenza statisticamente significativa rispetto alla mortalità registrata in tutti i gruppi vaccinati ( $p < 0.05$ ) (Figura 2). Confrontando le diverse formulazioni vaccinali solo la protezione conferita per via «intraperitoneale» si discosta significativamente da quella conferita dalle altre forme vaccinali, che hanno avuto valori RPS tra loro sovrapponibili (Figura 3).

## Discussione

I nostri risultati concordano con quelli riportati da Fabris *et al.* (7) che, in prove di vaccinazione intraperitoneale con FKC + ECP su spigole di peso superiore (15-20 g), hanno ottenuto una ottima protezione (RPS 87,5%).

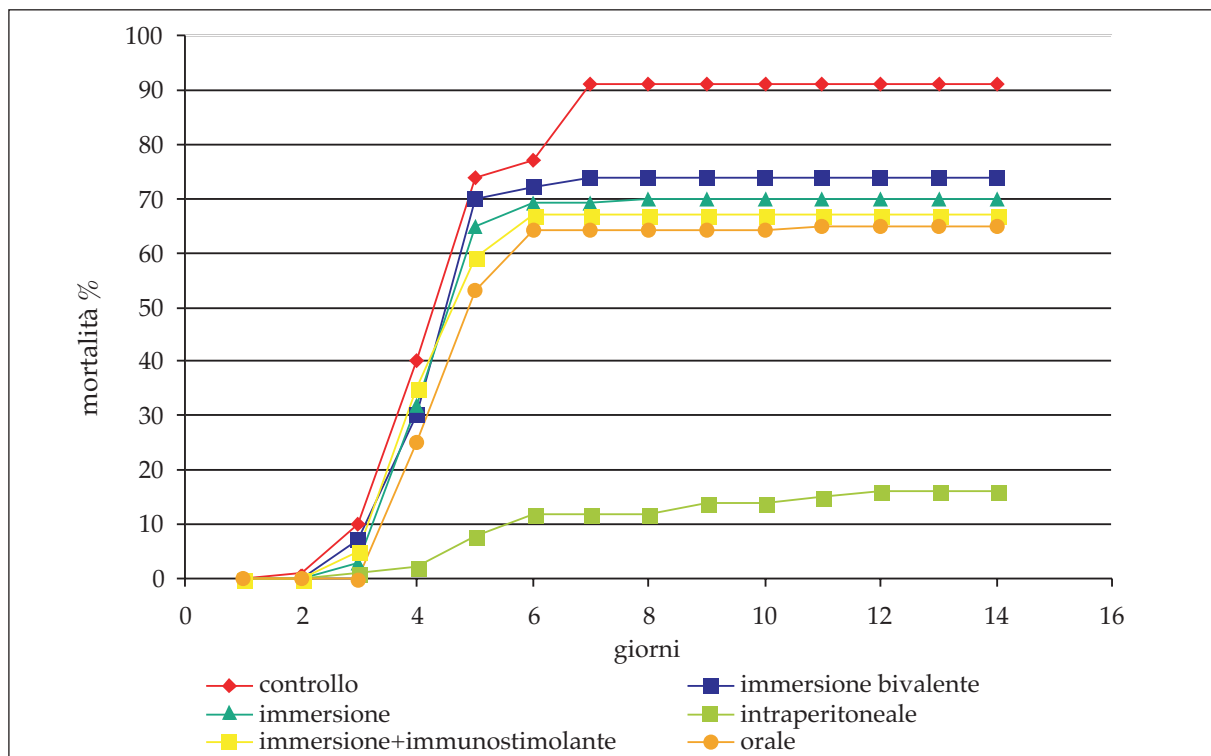


Figura 1  
Mortalità osservata dopo l'infezione sperimentale

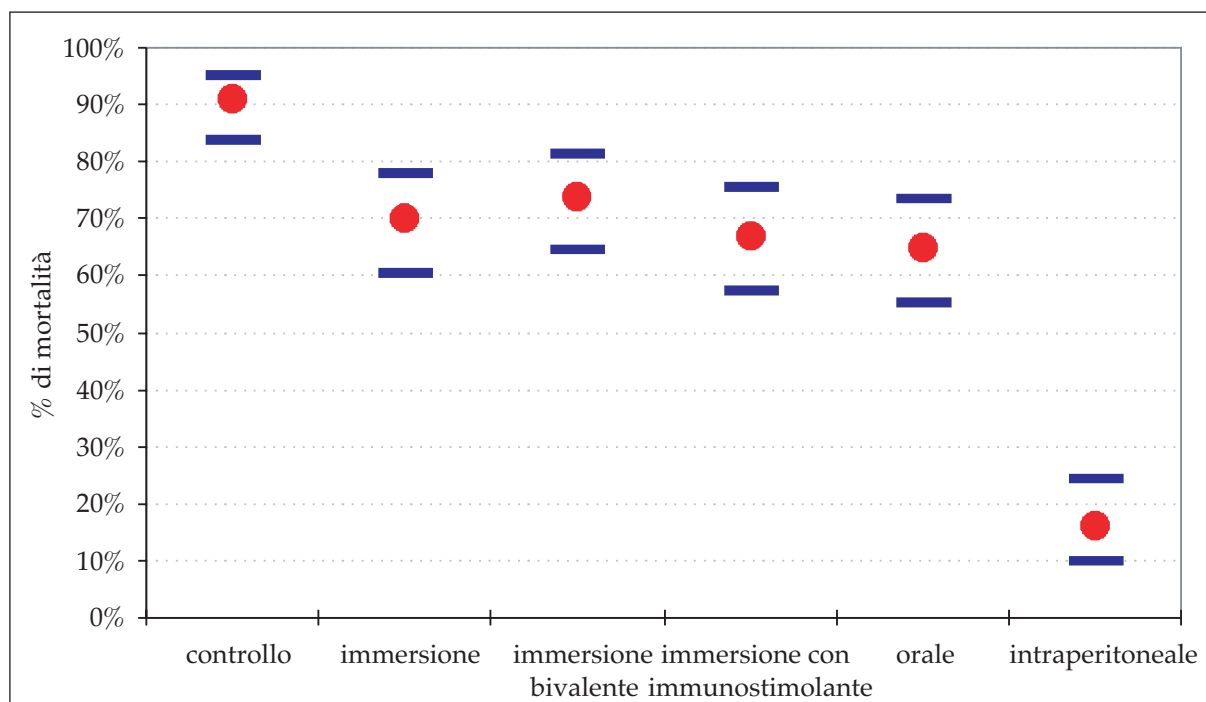


Figura 2  
Percentuale di mortalità ed intervalli di confidenza

Tabella I  
RPS, mortalità e limiti fiduciari (95%)

Gruppi	RPS%	Mortalità %	l.f.i	l.f.s.
Controllo	-	91	83,8	95,1
Immersione	23,1	70	60,4	78,1
Immersione bivalente	18,7	74	64,6	81,6
Immersione+ immunostimolante	26,4	67	57,3	75,4
Orale	28,6	65	55,2	73,6
Intraperitoneale	82,4	16	10,1	24,4

l.f.i. = limite fiduciari inferiori; l.f.s. = limiti fiduciari superiori.

Nel lavoro di Bakopoulos *et al.* (2) nessuna protezione era stata ottenuta quando l'efficacia del vaccino è stata testata con infezione sperimentale per via intraperitoneale.

Gravningen *et al.* riferiscono di una prova effettuata con vaccino commerciale bivalente (*V. anguillarum* e Phdp) per immersione che ha ottenuto un RPS di 73,68 (9)

L'elevata protezione conferita dagli ECP è stata indicata anche in precedenti studi (13,14), bisogna comunque annotare che gli ECP hanno potere tossico: la  $LC_{50}$  a 72 ore è di 1,8 mg di proteine/g peso vivo, somministrati per intraperitoneo a rombo (*Scophthalmus maximus*), mentre già a concentrazioni di 0,0009 mg di proteine/ml si ha effetto citotossico (13).

Tra le formulazioni per immersione la vaccinazione bivalente con *Vibrio anguillarum* non ha conferito una protezione migliore rispetto alle altre formulazioni per immersione, quindi la protezione crociata attribuita al *V. anguillarum* nei confronti di altri agenti eziologici, *Aeromonas salmonicida* (15) e *Streptococcus* sp. (18) non si è manifestata nei confronti di *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* e questo appare confermato anche in altri studi (11). La formulazione orale ha dato una buona protezione (RPS 28,6%), grazie sia alle ridotte dimensioni dei granuli (5) sia al rivestimento dell'antigene con chitosano, che, in accordo con altri autori (10, 16, 17), protegge dall'inattivazione dell'antigene operata dai fluidi gastrici. La protezione è incoraggiante soprattutto in considerazione che il vaccino è stato somministrato per via naturale ovvero con il mangime, non ci sono infatti risultati analoghi se non in studi effettuati somministrando l'antigene mediante intubazione orale e/o anale (2, 6, 12), tecnica che facilita l'uptake dell'antigene

ma non è poi di fatto realizzabile nella pratica di allevamento

La formulazione orale ha ottenuto quindi un buon risultato, leggermente migliore, anche se non evidenziato statisticamente, alle formulazioni per immersione, e questo incoraggia a proseguire gli studi valutando l'assorbimento, la validità di diversi dosaggi e di tecniche di incapsulazione meno costose. La vaccinazione orale è infatti di gran lunga preferibile alle altre vie di somministrazione, in quanto non provoca alcuno stress negli animali trattati, e permette la profilassi di massa senza costi aggiuntivi di manodopera.

## Ringraziamenti

Il lavoro è stato realizzato nell'ambito della Ricerca Corrente, Bando 2004, finanziata dal Ministero della Salute. Si ringraziano coloro che hanno collaborato alla realizzazione di questa sperimentazione, in particolare il Dipartimento

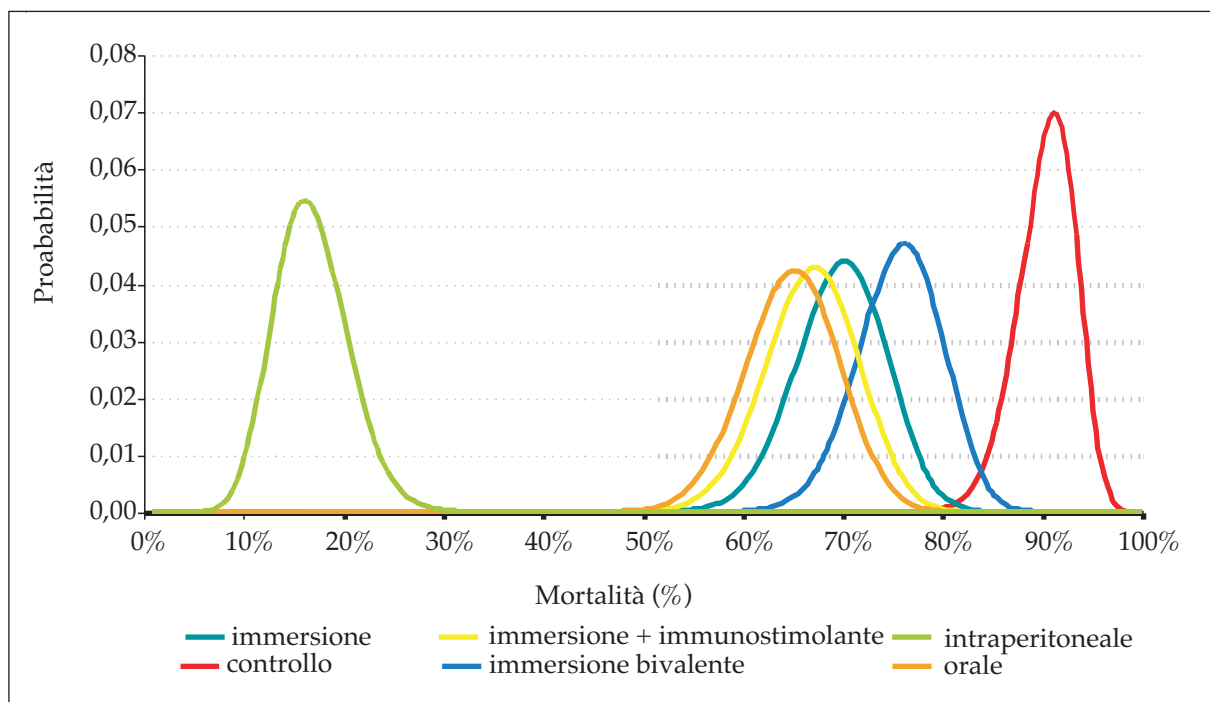


Figura 3  
Distribuzione beta della percentuale di mortalità

di Produzione Animale, Divisione di Biologia e Patologia Animale dell'Università di Udine, il dott. Amedeo Manfrin (IZS Venezia), il dott. Fulvio Salati (IZS Sardegna), il Reparto Vaccini batterici, terreni & tecnologie (IZS dell'Abruzzo & del Molise), il dr. Jelena Filipovic-Grgic (Dipartimento di Farmacia, Università di Zagabria, Croazia).

## Bibliografia

1. Amend D.F. 1981. Potency testing of fish vaccines. International Symposium on Fish Biologics: Serodiagnostic and Vaccines. *Dev Biol Stand*, **49**, 447-454.
2. Bakopoulos V., Volpatti D., Gusmani L., Galeotti M., Adams A. & Dimitriadis G.J. 2003. Vaccination trials of sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.), against *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, using novel vaccine mixtures. *J Fish Dis*, **26**, 77-99.
3. Bradford M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72**, 248-254.
4. Ceschia G., Quaglio F., Giorgetti G., Bertoja G. & Bovo G. 1991. Serious outbreak of pasteurellosis (*Pasteurella piscicida*) in euryhaline species along the Italian coasts. Abstract, International conference European Association of Fish Pathologists, Budapest, Hungary, 29.
5. Eldridge J.H., Hammond C.J., Meulbroek J.A., Staas J.K., Gilley & Tice T.R. 1990. Controlled vaccine release in the gut-associated lymphoid tissue. I. Orally administered biodegradable microspheres target the Peyer's Patches. *J Control Rel*, **11**, 205-214.
6. Esteve-Gassent M.D., B. Fouz & Amaro C. 2004. Efficacy of a bivalent vaccine against eel diseases caused by *Vibrio vulnificus* after its administration by four different routes. *Fish Shellfish Immunol*, **16**, 93-105.
7. Fabris A., Mazzolini E., Magni A., Ceschia G., Vismara D., Passera A. & Giorgetti G. 1998. Vaccination trials with *Pasteurella piscicida* different preparations and correlation with humoral immunity in sea bass. *Boll. Soc. It. Patol. Ittica*, **24**, 2-9.
8. Gautier G., Lafay B., Ruimi R., Breittmayer V., Nicolas J.L., Gautier M. & Christen R. 1995. Small subunit rRNA sequences and whole DNA relatedness concur for the reassignment of *Pausterella piscicida* (Snieszko *et al*) Janssen and Surgalla to the genus *Photobacterium* as *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Int J Sys Bacteriol*, **45**, 139-144.
9. Gravningen K., Thorarinsson R., Johansen L.H., Nissen B., Rikardsen K.S., Greger E. & Vigneulle M. 1998. Bivalent vaccines for sea bass (*Dicentrarchus labrax*) against vibriosis and pasteurellosis. *J Appl Ichthyol*, **14**, 159-162.
10. Johnson K.A. & Amend D.F. 1993. Efficacy of *Vibrio anguillarum* and *Yersinia ruckeri* bacterins applied by oral anal intubation of salmonids. *J Fish Dis*, **6**, 473-476.
11. Kawakami H., Shinohara N. & Sakai M. 1998. The non-specific immunostimulation and adjuvant effects of *Vibrio anguillarum* bacterin, M-glucan, chitin or Freund's complete adjuvant in yellowtail *Seriola quinqueradiata* to *Pasteurella piscicida* infection. *Fish Pathol*, **33**, 287-292.
12. Lillehaug A. 1989. Oral immunization of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, against vibriosis with vaccines protected against digestive degradation. *J Fish Dis*, **12**, 579-584.
13. Magarinos B., Santos Y., Romalde J. L., Rivas C., Barja J. L., & Toranzo A.E. 1992. Pathogenic activities of live cells and extracellular products of pathogen *Pasteurella piscicida*. *J Gen Microbiol*, **12**, 2491-2498.
14. Mazzolini E., Fabris A., Ceschia G., Vismara D., Magni A., Passera A., Danielis L & Giorgetti G. 1997. Pathogenetic variability of *Pasteurella piscicida* during *in vitro* cultivation as a preliminary study for vaccine production. International Workshop, Aquaculture Application of Controlled Drug and Vaccine Delivery, Villa Manin di Passariano (UD).



15. Norqvist A., Hagstrom A. & Wolf-Watz H. 1989. Protection of rainbow trout against vibriosis and furunculosis by use of attenuated strains of *Vibrio anguillarum*. *Appl Environ Microbiol*, **55**, 1400-1405.
16. Piganelli J.D., Zhang J.A., Christensen J.M. & Kattari S.L. 1994. Enteritic coated microspheres as an oral method for antigen delivery to salmonids. *Fish Shellfish Immunol*, **4**, 88-179.
17. Romalde J.L., A. Luzardo-Alvarez, C. Ravelo, A. E. Toranzo & Blanco-Mendez J. 2004. Oral immunization using alginate microparticles as a useful strategy for booster vaccination against fish lactococcosis. *Aquaculture*, **236**, 119-129.
18. Sakai M., Atsuta S. & Kobayashi M. 1995. Efficacies of combined vaccine for *Vibrio anguillarum* and *Streptococcus* sp. *Fish Sci*, **61**, 359-360.