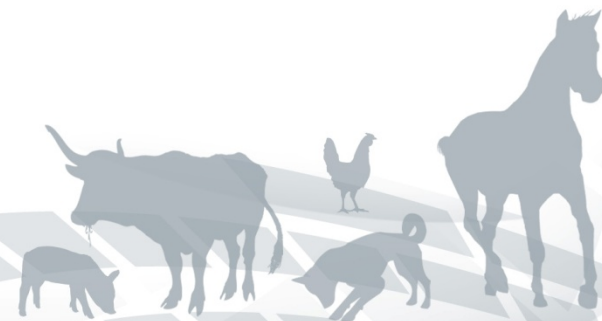




ISTITUTO G. CAPORALE
TERAMO

Somministrazione per via orale di vaccini nella trota in allevamento: un possibile compromesso fra efficacia dell'intervento e benessere degli animali

“Dalla Sanità e Benessere degli Animali alla Sicurezza Alimentare: linee strategiche e risultati della ricerca condotta dall'Istituto G. Caporale”
Teramo, 9 luglio 2012



- In acquacoltura, la vaccinazione è una delle strategie più efficaci e razionali per il controllo delle malattie infettive e diffuse, ad eziologia batterica.
- Una buona copertura vaccinale permette di ridurre l'utilizzo di chemioterapici nel corso dell'intero ciclo di produzione, salvaguardando la qualità del prodotto (inibenti e residui nelle carni) e limitando l'impatto ambientale.



Vie di somministrazione di vaccini nelle specie ittiche

- via intraperitoneale: usata soprattutto nei riproduttori di elevato valore economico, necessita di anestesia;
- immersione: tecnica semplice e rapida, ma che determina elevato stress per gli animali (manipolazioni);



Vie di somministrazione di vaccini nelle specie ittiche

- per nebulizzazione (spray): la soluzione vaccinale è micronizzata sulla superficie del pesce; richiede attrezzature costose;
- per via orale: il vaccino è mescolato con l'alimento e viene assorbito dall'apparato digerente del pesce. **Possibile degradazione e inattivazione dell'Ag ad opera del pH gastrico.**



L'esperienza di ICT nella studio e formulazione di vaccini stabulogeni somministrabili per via orale:

- Pasteurellosi della spigola (*Dicentrarchus labrax*) – 2004
- Yersiniosi o Bocca Rossa della trota (*Oncorhynchus mikiss*) 2007
- Yersiniosi o Bocca Rossa della trota 2009







Vaccinazione orale contro la Pasteurellosi della spigola (Paolini et All, Veterinaria Italiana vol 41/2005)

- Cinque differenti forme vaccinali:
 1. orale,
 2. intraperitoneale,
 3. immersione,
 4. immersione bivalente (+ Bacterin *Vibrio anguillarum*)
 5. Immersione con immunostimolante



Risultati

- Ottimi risultati per l'inoculo intraperitoneale
- Risultati sovrapponibili fra immersione e somministrazione orale



Prove di vaccinazione per via orale nella trota

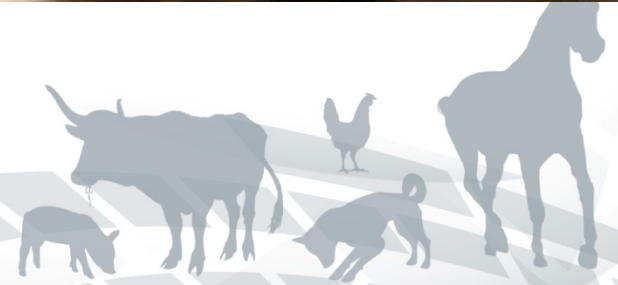





MALATTIA DELLA BOCCA ROSSA - ERM

EMR Sintomi esterni

SINTOMI ESTERNI
...a volte diffuse
emorragie
della bocca, lingua
e della gola





La Yersiniosi è la patologia batterica con maggiore impatto economico nell'allevamento della trota iridea in Italia:

- colpisce i pesci di tutte le taglie
- Si verifica durante tutto l'arco dell'anno
- È una malattia condizionata (spesso consecutiva ad eventi stressanti per gli animali (selezioni, manipolazioni))



ERM

- > Tempi di sospensione
- > biomasse presenti
- < Crescita per danno enterico
- < Rese del mangime (enterite);
- > Mortalità dei pesci;
- > Consumo antibiotici;
- > Manodopera



Yersinia (ERM) outbreaks are expensive!

100 000 Fish, 80 g over 10 weeks	Heavily impacted Raceway	Less heavily impacted raceway	No ERM outbreak
Weekly mortality	2 %	0,7 %	0,3 %
Mean weekly growth	5 %	9 %	11 %
Conversion Index	1,9	0,99	0,82
Number of survivors	83375	93874	97332
Biomass achieved (kg)	2347	8311	11918
Feed consumption (kg)	4460	8228	9773
Feed costs (€)	3 567,94 €	6 582,05 €	7 818,43 €
Benefit (Selling price - treatment cost - feed cost)	16 802,29 €	25 388,95 €	32 018,25 €
Difference with raceway unaffected by ERM	15 215,97 €	6 629,31 €	-€

Cost of mortality and treatment:
Not the most important!

Dati su 100.000 trote di 80 g in 10 settimane - A. Beljean





ISTITUTO G. CAPORALE
TECNOLOGIA

Prima prova di vaccinazione orale contro la yersiniosi della trota

- Prove di campo effettuate in allevamento
- Vaccino da ceppo isolato da focolaio di campo, verificatosi nello stesso impianto
- costituito da cellule intere intere di *Y.ruckeri*, formolate (FKC), liofilizzate e microincapsulate in microsfere di alginato di calcio, e rivestite di chitosano
- Due gruppi sperimentali da 200.000 trotelle di 30 gr, vaccinate per immersione al peso di 2 gr in avannotteria
- Vaccino sospeso in olio di pesce, miscelato al mangime e somministrato per 10 gg (5-5-5-)



Risultati

- Infezione naturale in allevamento (due focolai distanziati di tre mesi)
- gruppo di controllo (mortalità 2,25%), gruppo vaccinati (mortalità 0,62%)
- Peso medio finale dopo sei mesi:
 - controllo 110 gr.
 - vaccinati 162 gr





ISTITUTO G. CAPORALE
TERAMO

Ricerca Corrente 2007-2010

Ministero della Salute

Prove di efficacia di vaccini somministrati per via orale, contro la Yersiniosi della trota iridea allevata

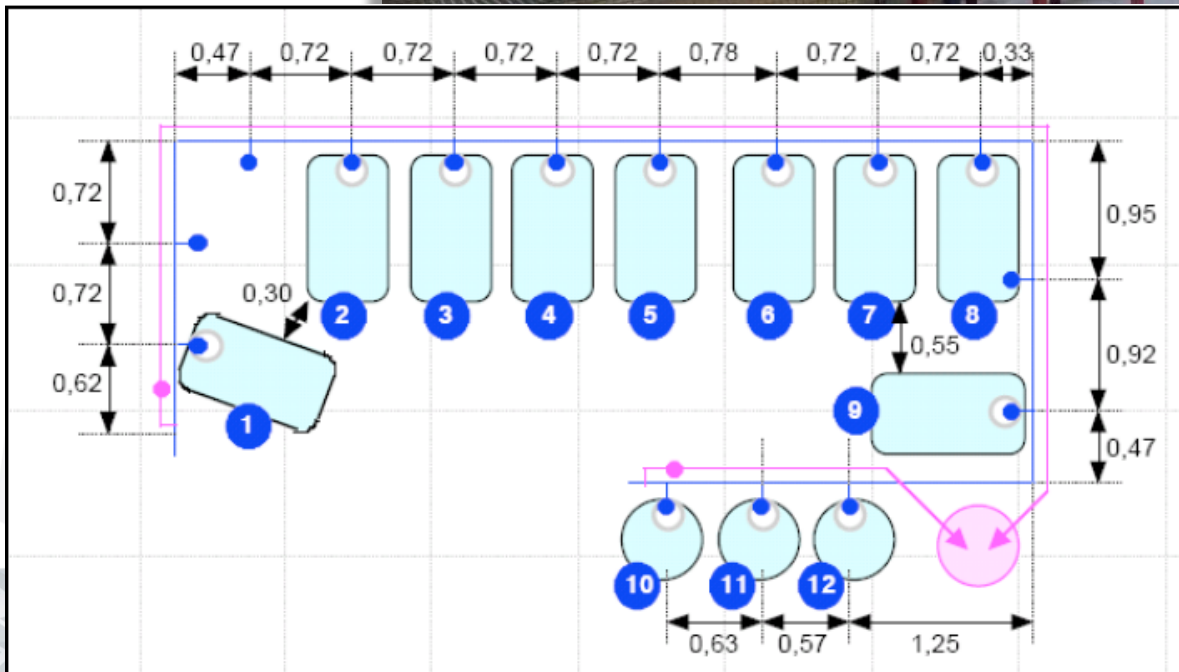








Impianto sperimentale di Capestrano Bussi sul Tirino (PE)



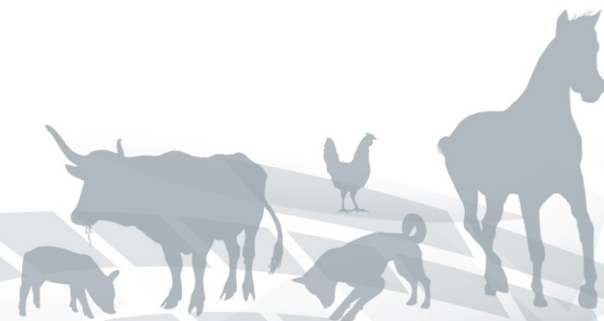


ISTITUTO G. CAPORALE
TERAMO

Obiettivo del lavoro

comparare l'efficacia protettiva di diverse formulazioni vaccinali somministrate per via orale, in cui l'Ag è protetto dalla degradazione gastrica (microincapsulato) al fine di

Eliminare gli eventi stressanti rappresentati dall'impiego di vaccini per immersione contro la Bocca rossa della trota



Materiali e metodi

- prove di vaccinazione in vasca presso l'impianto sperimentale di Capestrano
- vaccinazione di richiamo su trotelle (*Oncorhynchus mykiss*) del peso medio di 30 gr, già vaccinate in allevamento con vaccino commerciale al peso di 5gr (per immersione)
- vaccino sperimentale costituito da cellule intere di *Y. ruckeri* inattivate con aldeide formica (FKC) e microincapsulate



Materiali e metodi

- somministrazione del vaccino con l'alimento per 10 gg non consecutivi (5+5+5)
- formulazioni vaccinali differenti
 - per disponibilità dell'Ag (micronizzato, nanoparticolato, spray drying)
 - per composizione

(in associazione con FKC di *L. anguillarum*; Bacterin stimola immunità aspecifica)



Formulazioni vaccinali

Formulazioni vaccinali	Dose antigene (UFC)	Concentrazione totale microparticelle/pesce (UFC/g)
FKC <i>Y.ruckeri</i> incapsulato “Nano Particolato batterico” §	10 exp 8	7,4 x10 exp 6
FKC <i>Y.ruckeri</i> incapsulato 2006 “tecnica spray drying” [°]	10 exp 8	1,95 x10 exp 6
FKC <i>Y.ruckeri</i> incapsulato “Micronizzato” §	10 exp 8	7,4 x10 exp 6
FKC <i>Y.ruckeri</i> incapsulato 2006 “tecnica spray drying” [°] + FKC <i>L.anguillarum</i> “liofilizzato”	10 exp 8	1,95 x10 exp 6 + 2,5 x 10 exp 7

[°] prodotto da Fondazione Callerio, Trieste secondo le procedure descritte nel WO 2005/013941 (Brevetto Internazionale).

§ prodotto da Fondazione Callerio, Trieste – prodotti intellettuali ottenuti nell’ambito de progetto “Vettori orali dei vaccini per la piscicoltura del Friuli Venezia Giulia; L.R.26/05 art. 23.

Materiali e metodi

- la protezione vaccinale è stata valutata calcolando l'indice di sopravvivenza (Relative Percentage Survival)

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

- Le cause di mortalità sono state monitorate mediante tecniche diagnostiche classiche e di biologia molecolare



Materiali e metodi

- infezione sperimentale per via intraperitoneale, sei settimane dalla fine della vaccinazione



Materiali e metodi

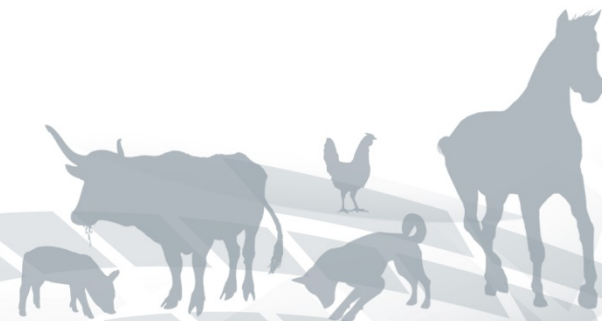
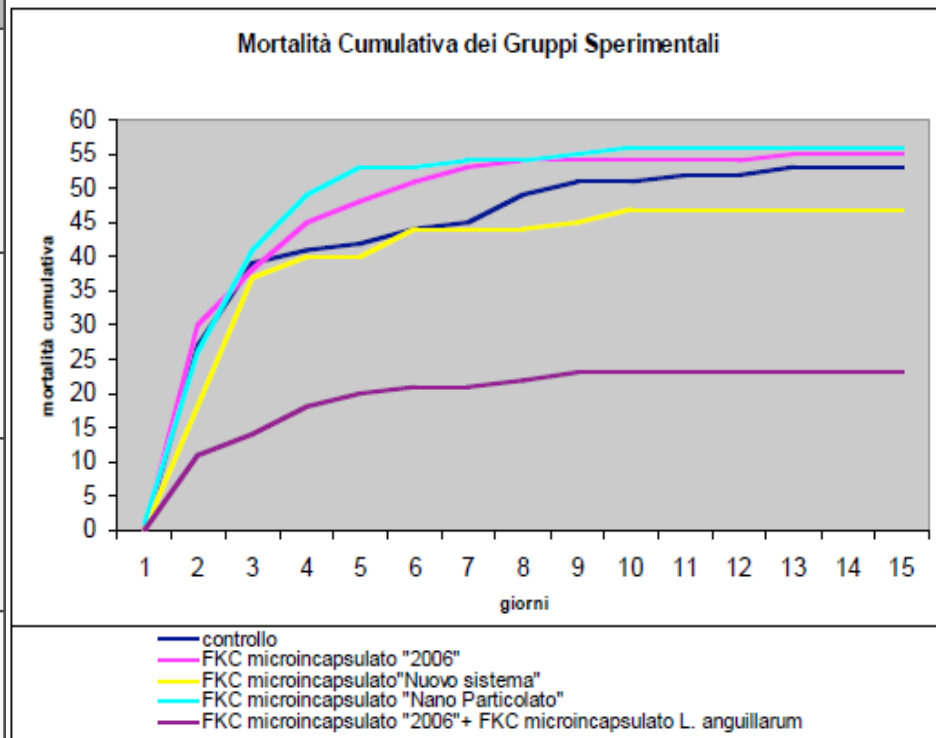
- valutazione della risposta anticorpale specifica indotta dalla somministrazione delle diverse formulazioni vaccinali mediante ELISA indiretta
- prelievo ematico a 5 e a 6 settimane dalla fine della vaccinazione



- la mortalità è stata valutata statisticamente rispetto al controllo attraverso il calcolo del rischio relativo (RR) e del suo intervallo di confidenza al 95%, analogamente è stato effettuato per il dato dell'RPS
- nessuna formulazione vaccinale ha significativamente protetto nei confronti dell'infezione sperimentale condotta per via intraperitoneale



Formulazioni vaccinali	Mortalità %	RPS %
FKC <i>Y.ruckeri</i> incapsulato "Nano Particolato batterico" §	93,33	/
FKC <i>Y.ruckeri</i> incapsulato 2006 "tecnica spray drying" °	91,67	/
FKC <i>Y.ruckeri</i> incapsulato "Micronizzato" §	79,66	6,81
FKC <i>Y.ruckeri</i> incapsulato 2006 "tecnica spray drying" ° + FKC <i>L.anguillarum</i> "liofilizzato"	76,67	10,31
Controllo	85,48	/



Risultati

- con lo studio effettuato con metodo ELISA sui sieri prelevati a 5 e a 6 settimane post-vaccinazione è stata messa in evidenza una risposta anticorpale specifica nei confronti di *Y.ruckeri*
- gli Ab non sono risultati protettivi nei confronti dell'infezione sperimentale, confermando quanto riportato in letteratura (Stevenson, 1997), di una mancanza di correlazione tra i titoli anticorpali e la protezione vaccinale



Conclusioni

- tra i diversi metodi di somministrazione di vaccini, la via orale è sicuramente la più pratica
 - permette la vaccinazione di pesci di tutte le taglie
 - non necessita di manipolazione del pesce evitando momenti stressanti
 - consente di ripetere la profilassi vaccinale in più momenti del ciclo produttivo (vaccino di richiamo)
- In questo lavoro non è stata dimostrata la capacità del vaccino somministrato per via orale, di stimolare buoni livelli di protezione



Conclusioni



La mancata protezione vaccinale potrebbe essere dovuta :

- agli involucri utilizzati e le tecniche di preparazione, formulati per essere protetti dalla degradazione gastrica
- alla scelta della via intraperitoneale per l'infezione sperimentale (vantaggio di una somministrazione uniforme dei batteri in ciascun pesce e l'immediata attivazione dei macrofagi e fagociti intraperitoneali, ma elude importanti barriere di difesa mucosale)





GRAZIE