

Episodio di mortalità cronica in branzini (*Dicentrarchus labrax*) causata da *Aeromonas sobria*

Outbreak of chronic mortality in sea bass (Dicentrarchus labrax) caused by Aeromonas sobria

**Amedeo Manfrin^{1*}, Katia Qualtieri¹, Silvia Friso¹, Roberto Perin¹,
Mirco Volpin¹, Lucia Selli¹, Andrea Novelli², Giuseppe Bovo¹, Renato Zanoni³**

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie – Legnaro (PD)

² Ittica Caldoli – Poggio Imperiale (FG)

³ Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale – Ozzano Emilia (BO)

RIASSUNTO – Durante la stagione 2001-2002, in un allevamento intensivo di branzini (*Dicentrarchus labrax*), si è verificato un episodio di mortalità cronica, durato alcuni mesi, che ha comportato gravi perdite economiche per l'allevatore. I soggetti, tutti di taglia superiore ai 200 g., erano allevati in gruppi da 25.000 in 12 vasche a terra da 300 m³ ciascuna, alimentate con acqua di pozzo avente salinità pari al 3-4‰ e alla temperatura costante di 25° C ± 1° C. All'esame clinico i branzini presentavano letargia, atassia locomotoria e difficoltà respiratoria e la mortalità era di 40-50 soggetti per vasca al giorno. Da 16 soggetti sono stati effettuati l'esame anatomico-patologico, parassitologico, batteriologico, virologico ed istologico. All'esame autoptico tutti gli animali presentavano gravi lesioni emorragiche sulle pinne, sulla cute e negli organi interni e alcuni di essi dei focolai necrotici granulomatosi a carico di rene, fegato e milza. L'esame virologico è risultato negativo, mentre da fegato, rene, cervello e milza di tutti i soggetti è stato isolato in purezza *Aeromonas sobria*. Il ceppo è stato successivamente somministrato per via i.p., per bagno e per via branchiale a gruppi di 10 branzini riproducendo in essi sia la sintomatologia clinica sia le lesioni istopatologiche riscontrate durante l'episodio di mortalità cronica in allevamento. Da tutti i soggetti, inoltre, è stato nuovamente isolato in purezza il ceppo di *A. sobria* utilizzato per l'infezione sperimentale. In conclusione, è possibile affermare che anche ceppi di solito scarsamente patogeni per le specie marine, come è il caso di *A. sobria*, in particolari condizioni (alta densità degli animali, scarsa salinità o alimentazione spinta) sono in grado di originare episodi di malattia che, se interessano animali a fine ciclo produttivo, a lungo termine possono determinare gravi perdite economiche.

*SUMMARY - During the 2001-2002 season, an outbreak of chronic mortality occurred in an intensive farm producing sea bass (Dicentrarchus labrax). Lasting several months, it involved serious commercial losses for the farmer. The subjects, all exceeding 200 g. in weight, were farmed in groups of 25,000 in 12 earth tanks of 300 m³ each, supplied with well water with salinity of 3-4‰ at a constant temperature of 25° C ± 1° C. Upon clinical examination, the bass were lethargic, and showed motor ataxia and difficulty in breathing. Mortality was 40-50 fish per tank per day. Anatomico-pathological, parasitological, bacteriological, histological and virological examinations were carried out on 16 specimens. Upon autopsy, all animals showed severe haemorrhagic lesions on fins and skin and in internal organs. Some of them had granulomatous necrotic foci in kidney, liver and spleen. Virological results were negative and pure strains of *Aeromonas sobria* was isolated from the liver, kidney, brain and spleen of all subjects. The strain was then inoculated i.p., by immersion and through the gills, in groups of 10 sea bass. Both the clinical symptoms and the histopathological lesions found during the outbreak were reproduced. The pure strain of *A. sobria* used for experimental infection was also re-isolated from all subjects. In conclusion, even strains usually poorly pathogenic for marine species, like *A. sobria*, in particular conditions (high stocking density, low salinity or intensive feeding) may give rise to outbreaks of disease which may cause serious economic damage in the long term.*

Key words: *Aeromonas sobria*, *Dicentrarchus labrax*, Chronic mortality.

* Corresponding Author: c/o Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Viale dell'Università, 10 – 35020 Legnaro (PD) – Italy. Tel. 049-8084248; Fax 049-8084392; E-mail: manfrin@izsvenezie.it

INTRODUZIONE

Nell'ambito del genere *Aeromonas*, *A. salmonicida* risulta essere la principale specie patogena per numerose specie d'acqua dolce e salata, mentre *A. hydrophila*, *A. caviae* e *A. sobria* solitamente rientrano nelle cosiddette "motile Aeromonad species", in grado di causare sindromi setticemico-emorragiche, ascite e mortalità variabili in funzione della specie e della virulenza dei diversi sierotipi. Mentre per *A. hydrophila* il ruolo di patogeno è indiscusso, per quanto riguarda *A. caviae* e *A. sobria* l'importanza nell'ambito delle malattie batteriche degli organismi acquatici è ancora oggetto di discussione (Austin & Austin, 1999). *A. sobria* è stato di frequente associato ad episodi di tossinfezione alimentare nell'uomo per consumo di prodotti ittici (Bottarelli & Ossiprandi, 1999), ma esistono sporadiche segnalazioni di episodi di malattia, sia in acqua dolce che salata, sicuramente causate da tale specie batterica (Toranzo *et al.*, 1989; Qihuan *et al.*, 1991; Bretzinger *et al.*, 1999; Mokhlasur *et al.*, 2002).

Il nostro lavoro si riferisce ad un episodio di malattia cronica, verificatosi durante la stagione 2001-2002 in un allevamento intensivo di branzini (*Dicentrarchus labrax*), durato alcuni mesi e che ha comportato gravi perdite economiche per l'allevatore, in quanto colpiva prevalentemente soggetti di taglia superiore ai 200 g. giunti quasi al termine del ciclo produttivo.

Partendo dal ceppo di campo isolato durante tale episodio, inoltre, l'infezione è stata riprodotta sperimentalmente in acquario, determinando negli animali gli stessi sintomi e le stesse lesioni riscontrati nel focolaio naturale.

MATERIALI E METODI

I branzini (*Dicentrarchus labrax*), tutti soggetti di taglia superiore ai 200 g., erano allevati in gruppi da 25.000 in 12 vasche in terra da 300 m³ ciascuna, alimentate con acqua di pozzo avente salinità pari al 3-4‰ e alla temperatura costante di 25° C ± 1° C.

Da 16 soggetti in stato preagonico sono stati effettuati l'esame anatomico-patologico, parassitologico da cute, branchie, intestino, rene, milza, fegato e cistifellea, e batteriologico da rene, fegato, milza e cervello mediante semine in Marine Broth (MB), Heart Infusion Broth (HIB), Agar Sangue (AS), Marine Agar (MA) e Thiosulphate Citrate Bile Sucrose Agar (TCBS).

L'esame virologico è stato condotto mediante semina su cellule SSN-1 (Striped Snakehead o *Channa striatus*), EPC (Epithelioma Papulosum Cyprini) e BF-2 (Blue-gill Fibroblasts) partendo dai seguenti organi (cervello, rene, milza), mentre l'istologico è stato effettuato dagli organi che presentavano lesioni apprezzabili macroscopicamente.

I ceppi batterici sono stati sottoposti alle prove biochimiche primarie (colorazione di Gram, semina in Kligler Iron Agar, test Vibriostat O129 con dischetti da 10 µg e 150 µg, catalasi e ossidasi, nitrati, string test; semina in SIM, crescita in acqua peptonata alcalina allo 0%, 3%, 8% di NaCl) e successivamente a prove biochimiche secondarie in macro e micrometodo (API 20E, API 20NE, BioMerieux). Di ciascun ceppo è stato effettuato il test di sensibilità agli antibiotici mediante la tecnica della diffusione in agar (Kirby-Bauer) utilizzando i seguenti dischetti: AML 25 (amoxicillina 25 µg), ENR 5 (enrofloxacin 5 µg), FFC 30 (florfenicolo 30 µg), OT 30 (ossitetraciclina 30 µg), SXT 25 (sulfametoxazolo 23,75 µg + trimetoprim 1,25 µg), TE 30 (tetraciclina 30 µg), TP 30 (tiamfenicolo 30 µg), UB 30 (flumequine 30 µg).

Per un'ulteriore verifica delle caratteristiche biochimiche, il ceppo isolato è stato inviato al Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale dell'Università di Bologna.

Il ceppo è stato inoltre somministrato per via i.p. (0,2 ml/pesce di una sospensione avente titolo finale 10^4 ufc/ml), per bagno (10 minuti ad una concentrazione di 10^4 ufc/ml) e per via branchiale mediante spruzzatura con 0,2 ml di 10^4 ufc/ml, a 3 gruppi di 10 branzini stabulati presso l'acquario sperimentale dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, riproducendo le stesse condizioni ambientali presenti in allevamento (salinità 3-4‰ e temperatura di $25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$). In parallelo sono stati costituiti 3 gruppi di controllo a cui è stata somministrata, con le stesse modalità, della soluzione fisiologica allo 0,9%.

RISULTATI

All'esame clinico i soggetti presentavano letargia, atassia locomotoria e difficoltà respiratoria e la mortalità era di 40-50 soggetti per vasca al giorno.

All'esame autoptico tutti gli animali hanno mostrato gravi lesioni emorragiche sulle pinne, sulla cute e negli organi interni e, alcuni di essi, dei focolai necrotico granulomatosi a carico di rene, fegato e milza. L'unica patologia parassitaria riscontrata era una modesta diplectanosi branchiale (*Diplectanum* sp.).

L'esame istologico ha potuto evidenziare malattia branchiale, con presenza di alcuni trematodi, epicardite linfocitaria, steatosi epatica diffusa, focolai necrotico-granulomatosi di origine batterica al fegato, rene e milza, focolai di mineralizzazione dei tubuli renali. L'esame virologico è risultato negativo, mentre da cervello, fegato, rene e milza di tutti i soggetti è stato isolato in purezza *Aeromonas sobria*. Le caratteristiche biochimiche principali del ceppo sono riportate nella Tabella 1.

Gli unici tests biochimici risultati anomali sono stati l'indolo, il VP e il rosso metile, che hanno dato esito negativo anziché positivo. Il ceppo di *A. sobria* si è dimostrato resistente a tutti gli antibiotici testati, mentre la mortalità durante l'infezione sperimentale è iniziata dopo 7 gg. ed è durata circa 15 gg., portando a morte il 90% dei soggetti in tutti i gruppi infettati; nessun soggetto dei gruppi di controllo è morto nei 30 gg. di osservazione.

Da tutti i soggetti, inoltre, è stato nuovamente isolato in purezza il ceppo di *A. sobria* utilizzato per l'infezione sperimentale.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

A. sobria è un batterio Gram negativo, frequentemente associato ad episodi di tossinfezione alimentare (Bottarelli & Ossiprandi, 1999) considerato fino agli anni '80 di scarso significato per le specie ittiche allevate, in quanto ritenuto non patogeno per i salmonidi (Austin & Austin, 1999), principale categoria ittica oggetto di acquacoltura nel mondo occidentale.

La prima segnalazione certa di patogenicità per il pesce è stata effettuata da Toranzo *et al.* (1989) relativamente ad un grave episodio che interessò nel 1987 i riproduttori di alosa americana (*Dorosoma cepedianum*, Leseuer) alle foci del fiume Potomac (Maryland, USA). Gli autori riuscirono anche a riprodurre sperimentalmente la malattia in trote iridee (*Oncorhynchus mykiss*) infettate i.p., ottenendo una DL_{50} pari a 2×10^5 ufc/ml.

Test	37° C	25° C
Ossidasi	+	+
Catalasi (da coltura in 24 ore su TSA)	+	+++
β emolisi a 24 ore	+	+
Crescita su TSA + 6 % NaCl a 24, 48, 72 h	-	-
Sensibilità Vibriostat O129 da 10 µg su AS/MH II	R/R	R/R
Sensibilità Vibriostat O129 da 150 µg su AS/MH II	R/R	R/S
Sensibilità Vibriostat O129 da 10 µg su MH II + 2,5 % NaCl	R/R	R/R
Sensibilità Vibriostat O129 da 150 µg su MH II + 2,5 % NaCl	S	S
Crescita su MAC	+	+
Crescita in acqua peptonata alcalina (APAC) 0/3/8 % NaCl	+/-	+/-
Mobilità in SIM a 24 ore	+	+
Indolo a 24, 48, 72, 96, 120 h	-	-
TSI a 24 h	*AG/H ₂ S-	*AG/H ₂ S+
Fermentazione su Purple broth:		
glucosio	*AG	*AG
saccarosio	*AG	*AG
salicina	-	-
Ornitina decarbossilasi a 48 h	-	-
Arginina deidrolasi a 48 h	+	+
Lisina decarbossilasi a 48 h	+	+
Esculina (prova in Agar Sangue Esculina)	-	-
Idrolisi urea	-	-
VP	-	-
Rosso metile	-	-
Profilo API 20 E a 24 h	7005124	3005104
Profilo API 20 NE a 24 h	5076705	5166755
Profilo API 20 NE a 48 h	5176745	5176755

*Legenda: A = acido; AG = acido + gas; H₂S = produzione di idrogeno solforato.

Tabella 1 - Principali caratteristiche biochimiche di *Aeromonas sobria*.
Table 1 - Main *Aeromonas sobria* biochemical characteristics.

Alcune segnalazioni del passato, però, potrebbero essere state falsate dal fatto che non sempre l'identificazione di *A. sobria* è semplice, soprattutto se ci si avvale solo ed esclusivamente di sistemi rapidi in micrometodo, per cui poteva essere facilmente confusa con *Aeromonas hydrophila* o *A. caviae* (Toranzo *et al.*, 1986; Toranzo *et al.*, 1989; Austin & Austin, 1999).

Le altre segnalazioni in bibliografia solitamente riconoscono ad *A. sobria* un ruolo di patogeno opportunista o di irruzione secondaria, frequentemente associato ad *A. hydrophila* (Mc Garey *et al.*, 1990; Qihuan *et al.*, 1991).

Nel nostro lavoro, invece, l'unico agente eziologico isolato in purezza da diversi organi di tutti i soggetti analizzati è risultato essere *A. sobria*. Tale diagnosi è stata confermata

istologicamente con l'evidenziazione di lesioni necrotico granulomatose di natura batterica al fegato, rene e milza ma, soprattutto, con l'infezione sperimentale.

Sia i soggetti infettati i.p. che quelli trattati per bagno o per spruzzatura sulle branchie dopo 7 giorni hanno iniziato a mostrare i primi sintomi, 9/10 sono morti, presentando le stesse lesioni macroscopiche ed istologiche riscontrate nei soggetti morti durante l'episodio naturale; da ciascuno di essi è stato possibile isolare nuovamente *A. sobria* in purezza.

L'unico aspetto anomalo di questo episodio è dato dal fatto che gli animali venivano allevati in condizione di salinità del 3-4‰, particolarmente bassa anche per una specie tipicamente eurialiana come il branzino.

L'altro aspetto importante da sottolineare è che l'episodio ha interessato prevalentemente soggetti di taglia superiore ai 200 g., solitamente più resistenti alle patologie batteriche tipiche dell'allevamento intensivo del branzino, e che altri animali allevati nella stessa azienda (*Sciaenops ocellatus* o red drum) non hanno mai manifestato alcun sintomo. Dall'anamnesi svolta in allevamento sono emersi inoltre altri due elementi interessanti da un punto di vista epidemiologico: l'inizio della patologia sembra essere stato successivo all'importazione di alcune partite di pesci ornamentali (*Carassius auratus*) che hanno presentato episodi di malattia con mortalità elevata, purtroppo non diagnosticata da un punto di vista eziologico. Inoltre nelle vasche in cui erano stabulati i branzini erano presenti numerose sanguisughe (*Hirudo medicinalis*), che periodicamente infestavano i cani posti a guardia dell'impianto.

A tal riguardo è interessante segnalare che *Hirudo medicinalis* vive in perfetta simbiosi con *A. veronii* biovar. *sobria* (ex *A. sobria*), unico ed esclusivo ospite del suo tratto digestivo (Graf, 1999; Indergand & Graf, 2000).

L'ipotesi che la sanguisuga possa essere stata il veicolo con cui il patogeno sia stato introdotto nelle vasche dell'allevamento è tutta da dimostrare; più probabilmente essa potrebbe aver svolto un ruolo di réservoir amplificatore dell'infezione.

In conclusione, è possibile affermare che anche ceppi di solito scarsamente patogeni per le specie marine, come è il caso di *Aeromonas sobria*, in particolari condizioni (alta densità degli animali, parametri dell'acqua non corretti o alimentazione spinta) sono in grado di originare episodi di malattia che, se interessano animali a fine ciclo produttivo, a lungo termine possono determinare gravi perdite economiche.

BIBLIOGRAFIA

- Austin B. & Austin D.A. (1999). Bacterial fish pathogens: disease of farmed and wild fish. *Springer Praxis Publishing, Chichester, U.K.*
- Bottarelli E. & Ossiprandi M.C. (1999). *Aeromonas* infections: an update. *Annali della Facoltà di Medicina Veterinaria Università di Parma*, 19: 347-372.
- Bretzinger A., Fischer-Scherl T., Oumouna M., Hoffman M. & Truyen U. (1999). Mass mortalities in koi carp, *Cyprinus carpio*, associated with gill and skin disease. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 19, 5: 182-185.
- Graf J. (1999). The symbiosis of *Aeromonas veronii* biovar *sobria* and *Hirudo medicinalis*: a novel animal model. *Infect. Immun.*, 67: 1-7.
- Indergand S. & Graf J. (2000). Ingested blood contributes to the specificity of the symbiosis of *Aeromonas veronii* biovar *sobria* and *Hirudo medicinalis*, the medicinal leech. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66: 4735-4741.
- Mc Garey D.J., Milanese L., Foley D.P., Reyes B. jr., Frye L.C. & Lim D.V. (1990). The role of motile aeromonads in the fish disease, ulcerative disease syndrome (UDS). *Experientia*, 47, 5: 441-444.

Mokhlasur R., Colque-Navarro P., Kuhn I., Huys G., Swings J. & Mollby R. (2002). Identification and characterization of pathogenic *Aeromonas veronii* biovar *sobria* associated with epizootic ulcerative syndrome in fish in Bangladesh. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, 2: 650-655.

Qihuan A., Pfeifang S., Lihua J. & Jiannong W. (1991). On the pathogenic bacteria of the haemolytic ascitesosis of allogynogenetic crucian carp. *J. Fish China Shuichan Xuebao.*, 15, 2: 130-139.

Toranzo A.E., Baya A.M., Romalde J.L. & Hetrick F.M. (1989). Association of *Aeromonas sobria* with mortalities of adult gizzard shad, *Dorosoma cepedianum* Lesueur. *J. Fish Dis.*, 12, 5: 439-448.

Toranzo A.E., Santos Y., Nieto T.P. & Barja J.L. (1986). Evaluation of different assays systems for identification of environmental *Aeromonas* strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, 51: 652-656.