

Brown Spot Disease: un fattore limitante la riproduzione controllata di mazzancolla (*Melicerthus kerathurus*)

Brown Spot Disease: a limiting factor for controlled reproduction of caramote prawn (Melicerthus kerathurus)

Monique Mancuso^{1*}, Renata Zaccone¹, Lucrezia Genovese¹,
Giulia Maricchiolo¹, Antonino Calabrò², Fabio Marino³

¹ Istituto per l'Ambiente Marino Costiero (IAMC)-CNR Sezione di Messina. Spianata S. Raineri, 86 - 98122 Messina; ² AUSL n° 5 - 98100 Messina; ³ Dip. Sanità Pubblica Veterinaria, Università degli Studi di Messina, Polo Universitario dell'Annunziata - 98168 Messina

RIASSUNTO: *Melicerthus (Penaeus) kerathurus* comunemente chiamata "mazzancolla", è una specie molto apprezzata per le sue carni e recentemente proposta per il ripopolamento. Le fasi di schiusa e le prime fasi dello sviluppo larvale sono quelle più delicate, in cui si riscontrano elevata mortalità (intorno 80% in pochi giorni) e sensibilità all'attacco microbico, particolarmente dalle specie batteriche appartenenti al genere *Vibrio* (*Vibrio alginolyticus*, *V. parahaemolyticus* e *Listonella (Vibrio) anguillarum*); tali batteri si comportano da opportunisti e diventano patogeni in condizioni di stress. Durante un esperimento di riproduzione controllata di *M. kerathurus*, è stato registrato un episodio di Brown Spot Disease; gli esemplari colpiti presentavano ulcere di colore marrone-verdastro sui dentelli post-rostrali, torace e addome ed in alcuni esemplari nei pereopodi. Per identificare l'agente patogeno, sono stati effettuati tamponi delle lesioni e sono stati prelevati campioni d'acqua dalla vasca di stabulazione, seminati su TCBS agar per la ricerca dei vibrioni totali e su Marine Agar 2216 per il conteggio dei batteri eterotrofi coltivabili. Sui ceppi isolati sono stati effettuati i test biochimici (ossidasi, catalasi, O/129) e fisiologici (crescita a differenti temperature e salinità); per l'identificazione è stato utilizzato un sistema miniaturizzato: API 20 E (bioMérieux). Le analisi effettuate hanno portato all'identificazione di *V. alginolyticus*, sia nelle lesioni dei soggetti analizzati che nell'acqua di stabulazione, confermando che i Vibrioni si comportano da germi opportunisti causando diverse patologie prevalentemente in organismi sottoposti a stress di varia natura come ad esempio: ambiente instabile o sub-ottimale, alta densità degli stock o errori di manipolazione.

SUMMARY: *Melicerthus (Penaeus) kerathurus* commonly named "caramote prawn", is a specimen very appreciated and recently proposed as a new species for reproduction. The hatching and larval stages are very sensitive to the microbial attack and the mortality is higher than the other stages of life. Vibriosis is the bacterial disease most common in larvae and post-larvae causing high mortality (about 80%) in few time, the species involved in this pathology are *Vibrio alginolyticus*, *V. parahaemolyticus* e *Listonella (Vibrio) anguillarum*, these *Vibrios* act as opportunistic bacteria and in stress conditions become dangerous for fish health. Here we reported a Brown Spot Disease episode occurred during a controlled reproduction experiment of *M. kerathurus*. Adult specimens showed brown-green ulcers on carapace, thorax, abdomen and in some specimens on pereopods. Sampling of lesions and water has been effectuated to identify the pathogen agent by microbial and histochemical methods. The results showed that all subjects were infected by *V. alginolyticus* and that confirm the opportunistic "nature" of this bacteria, that in stress conditions (sub-optimal environment, low water quality, high stock density or high manipulation) become pathogen.

Key-words: Bacterial diseases, Vibriosis, *Melicerthus kerathurus*, Eggs quality, Larval health.

* Corresponding Author: c/o Istituto per l'Ambiente Marino Costiero (IAMC)-CNR, Sezione di Messina. Spianata S. Raineri, 86 - 98122 Messina. Tel.: 090/669003; Fax.: 090/669007; E-mail: monique.mancuso@iamc.cnr.it.

INTRODUZIONE

La mazzancolla (*Melicerthus kerathurus*) è una specie molto apprezzata per le sue carni e recentemente è stata proposta come specie allevabile per il ripopolamento. Le fasi di schiusa e le prime fasi dello sviluppo larvale, sono le più delicate, durante tale periodo, generalmente si riscontrano elevata mortalità e sensibilità all'attacco microbico (Prayitno & Lacthford, 1995).

I vibrioni, che rappresentano la parte dominante della normale flora batterica, durante gli stadi di sviluppo larvale (Haamed, 1993), sono stati descritti come agenti patogeni di epidemie batteriche (Lightner, 1993). La Vibriosi è la patologia batterica più diffusa nei gamberi; colpisce gli adulti, le larve e le post-larve, provocando elevata mortalità (intorno 80% in pochi giorni) ed è attribuita alle specie *Vibrio alginolyticus*, *V. parahaemolyticus* e *Listonella (Vibrio) anguillarum*; tali batteri si comportano da opportunisti, fanno dunque parte della normale microflora batterica dell'acqua di mare e di quella associata a questi organismi (Gomez-Gill *et al.*, 1998); essi diventano patogeni quando sono presenti fattori di stress ambientali (determinati da inquinamento, manipolazione degli organismi, cambiamenti di temperatura, salinità, ecc.) ed ovviamente dipendono dalla recettività dell'ospite (Lightner & Redman, 1998).

I vibrioni, grazie alla loro capacità chitinolitica, penetrano all'interno del carapace, provocando la comparsa di macchie scure nei siti di infezione, quali la superficie corporea e le appendici (Brown Spot Disease).

Vibrio alginolyticus causa gravi perdite negli allevamenti di crostacei e molluschi; colpisce soprattutto gamberi, gamberetti e aragoste, provocando infezioni al carapace, all'epatopancreas e setticemia (Böhnel *et al.*, 1999).

L. anguillarum è un organismo marino ubiquitario e fa parte della normale flora microbica acquatica; può anche costituire parte della flora intestinale dei pesci marini e dei crostacei; se i fattori ambientali (ad es., sbalzi di temperatura) o fisiologici (ad es., fattori stressogeni) cambiano, si trasforma in un microrganismo altamente patogeno.

Altre malattie larvali dei crostacei sono legate a batteri luminescenti come *V. harveyi* (Diggles *et al.*, 2000) e *Vibrio* sp., spesso associate ad una bassa sopravvivenza larvale e problemi nella crescita (Saulnier *et al.*, 2000).

In questo lavoro abbiamo riportato le osservazioni effettuate su un episodio di Brown Spot Disease registrato durante un esperimento di riproduzione controllata di *M. kerathurus*.

MATERIALI E METODI

L'esperimento è stato condotto nell'ambito del progetto MIPAF RIPATT "Sperimentazione di una strategia di ripopolamento con *Melicerthus kerathurus* nella Fascia Costiera fra Capo San Marco e Capo Granitola" (MIPAF – CNR).

46 riproduttori (arrivati tra il 22 giugno e l'8 luglio 2005) sono stati posti a stabulare nelle vasche dell'Istituto IAMC di Messina.

I riproduttori stabulati il 22 giugno hanno emesso 158.000 uova dopo 2 giorni (temperatura 27,8° C, salinità 37‰), la percentuale di schiusa è stata del 17,4% ma la percentuale di mortalità larvale è stata dell'80%.

Sugli esemplari (riproduttori) che mostravano melanosi e ulcere sul carapace, sono stati effettuati tamponi dalle lesioni, al fine di identificare l'agente patogeno; inoltre sono stati prelevati dei campioni d'acqua dalla vasca di stabulazione; i campioni sono stati seminati su TCBS agar per la ricerca dei vibrioni totali e su Marine Agar per il conteggio dei batteri eterotrofi coltivabili.

Dai ceppi isolati dall'emolinfa e dalle lesioni sparse su carapace e uropodi, sono stati effettuati test biochimici (ossidasi, catalasi, O/129) e fisiologici (crescita a differenti temperature e salinità); per l'identificazione è stato usato il sistema miniaturizzato API 20E (bioMérieux); è stata saggiata l'attività enzimatica tramite l'API ZYM (bioMérieux) ed infine è stato effettuato l'antibiogramma su tutti i ceppi identificati.

Su 20 riproduttori è stato eseguito l'esame istologico. Sezioni trasversali dei gamberi, tagliate a tutto spessore a livello di cefalotorace, addome, telson e uropodi, al fine di effettuare osservazioni di tutti gli organi in visione d'insieme, venivano fissate in formalina tamponata al 10% e inclusi in paraffina. Sezioni istologiche dello spessore di 5 µm erano quindi colorate con Ematossilina-Eosina, PAS e Diff-quick.

RISULTATI

All'esame necroscopico i riproduttori presentavano melanosi del carapace, talora accompagnata da ulcere di colore marrone-verdastro sui dentelli post-rostrali, torace, addome e, in alcuni esemplari, nei pereopodi, con ulcere anche profonde marroni-verdastre.

I nauplii, già all'interno delle uova mostravano le estremità delle appendici rossastre; una volta arrivati alla schiusa, presentavano setole mancanti o malformate e focolai sul corpo; la mortalità registrata è stata del 80%.

L'esame istologico confermava la natura ulcerativo-melanotica della lesione del carapace. Nella maggior parte dei soggetti, la lesione rimaneva localizzata a livello superficiale interessando solamente l'esoscheletro. In alcuni distretti la cuticola appariva erosa, a tratti interrotta; si documentava melanosi di grado variabile a livello dello strato subepidermico che appariva fortemente ispessito nelle sedi di lesione. A volte, si potevano cogliere tratti di esoscheletro in cui la cuticola era ancora integra, ma sollevata, a formare cavità cistiche, otticamente vuote con tutti i tipi di colorazione usati, quali espressioni dell'edema.

In tre soggetti le lesioni raggiungevano i tessuti più profondi dove venivano documentate anche a carico del tessuto muscolare. I quadri più rappresentativi erano caratterizzati da edema, versamento di emolinfa e necrosi. Si poteva cogliere un infiltrato parvicellulare a carico degli spazi interstiziali tra le fibre muscolari che in alcuni casi apparivano dilatati, modificando la normale architettura del tessuto muscolare.

L'esame istologico confermava la natura ulcerativo-melanotica della lesione del carapace.

Le analisi effettuate hanno portato all'identificazione di 30 ceppi di *V. alginolyticus*, sia nelle lesioni che nell'acqua di stabulazione.

Dai test effettuati con l'API ZYM risultava la presenza dell'attività chitinolitica (N-acetil-β-glucosaminidasi) tipica di questi batteri, insieme ad altre attività enzimatiche (tabella 1).

I risultati dell'antibiogramma mostravano che i ceppi erano sensibili alla flumequina, sulfametazolo/trimetoprim e enrofloxacin ed erano resistenti a tetraciclina, ossitetraciclina e amoxicillina (tabella 2), in accordo con i risultati ottenuti da Hörmansdofer *et al.* (2000).

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Il nostro studio conferma la presenza di vibroni sia nell'acqua di stabulazione, sia nei riproduttori in differenti concentrazioni; poiché i vibroni sono stati ritrovati anche sui soggetti sani, si può concludere che questi batteri si comportano da opportunisti in accordo con Ruangpang & Kitao (1991) e Vandenberghe *et al.* (1998), causando vari tipi di patologie se gli organismi, soprattutto durante le prime fasi di sviluppo (uova o larve) sono sottoposti a stress di vario genere come ad esempio: ambiente instabile o sub-ottimale, alta densità degli

stock o un inadeguato sistema d'allevamento. La temperatura elevata delle condizioni d'allevamento ha favorito la crescita della specie *V. alginolyticus*, rispetto ad altre specie marine che hanno una temperatura ottimale più bassa.

Reazioni enzimatiche	Risposta
Fosfatasi alcalina	+++
Esterasi (C4)	++
Esterasi lipasi (C8)	+++
Lipasi (C14)	+
Leucina arilamidasi	+++
Valina arilamidasi	++
Cistina arilamidasi	---
Tripsina	++
α -chimotripsina	+++
Fosfatasi acida	+++
Naftol-AS-BI-fosfoidrolasi	++
α -galattosidasi	---
β -galattosidasi	---
β -glucuronidasi	---
α -glucosidasi	---
β -glucosidasi	---
N-acetil- β -glucosaminidasi	++
α -mannosidasi	---
α -fucosidasi	---

Tabella 1: Risultati dei test di attività enzimatica di *Vibrio alginolyticus* mediante API ZYM.
 Table 1: Results of enzymatic tests of *Vibrio alginolyticus* by API ZYM.

Principi attivi	Sensibile/Resistente
Flumequina	S
Sulfametazolo/trimetoprim	S
Enrofloxacina	S
Tetraciclina	R
Ossitetraciclina	R
Amoxicillina.	R

Tabella 2: Risultati dell'antibiogramma sugli isolati di *Vibrio alginolyticus*.
 Table 2: Antibiotic susceptibility tests results of *Vibrio alginolyticus* strains.

I vibrioni, grazie alla loro capacità chitinolitica, aderiscono facilmente al carapace, provocando la comparsa di macchie scure nei siti di infezione, quali la superficie corporea e le appendici (Brown Spot Disease); inoltre possono provocare la cosiddetta “setticemia batterica”.

Le operazioni di cattura, trasporto e manipolazione in genere, devono essere effettuate con estrema cautela al fine di non causare microlesioni al carapace, le quali si possono infettare per la presenza di specie di *Vibrio* opportuniste.

Tali precauzioni sono particolarmente importanti nel caso di soggetti destinati alla riproduzione, in quanto la trasmissione precoce della malattia (uova e stadi larvali) causa elevata mortalità, come registrato in questo caso.

Nel caso oggetto di questo studio, il breve tempo intercorso tra la cattura e la deposizione suggerisce che la causa della malattia fosse preesistente al trasferimento in vasca dei riproduttori. Il trasporto effettuato senza refrigeratori può aver giocato il ruolo principale come fattore stressogeni, scatenante la malattia. E' indubbio che i gamberi possano albergare tra la loro normale flora microbica diverse specie di *Vibrio* (Gomez-Gil *et al.*, 1998), senza risentirne in natura. In condizioni di cattività, le molteplici cause di stress favoriscono la proliferazione dei patogeni inducendo la comparsa della sintomatologia. Si rende quindi necessario ottimizzare le manualità di cattura e trasferimento dei soggetti al fine di minimizzare lo stress e le relative ripercussioni igienico-sanitarie.

BIBLIOGRAFIA

Böhnel H., Lohavanijaya P., Rungin S., Schnug C. & Seifert H.S.H. (1999). Active immunization of black tiger prawn (*Penaeus monodon*) against vibriosis in Thailand. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.*, 112: 289-295.

Diggles B.K., Moss G.A., Carson J. & Anderson C.D. (2000). Luminous vibriosis in rock lobster *Jasus verreauxi* (Decapoda: Palinuridae) phyllosoma larvae associated with infection by *Vibrio harveyi*. *Dis. Aquat. Org.*, 43: 127-137.

Gomez-Gil B., Tron-Mayén L., Roque A., Turnbull J.F., Inglis V. & Guerra-Flores A.L. (1998). Species of *Vibrio* isolated from hepatopancreas, haemolymph and digestive tract of a population of healthy juvenile *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 163: 1-9.

Haamed A.S. (1993). A study of the aerobic heterotrophic bacterial flora of hatchery-reared eggs, larvae and post-larvae of *Penaeus indicus*. *Aquaculture*, 117: 195-204.

Hörmansdofer S., Wentges H., Neugebauer-Büchler K. & Bauer J. (2000). Isolation of *Vibrio alginolyticus* from seawater aquaria. *Int. J. Hyg. Health*, 203: 169-175.

Lightner D.V. (1993). Diseases of cultured shrimp. In P.V. McVey (Ed.), *CRC Handbook of mariculture*; CRC Press, Boca Raton, Fla.: 393-486.

Lightner D.V. & Redman R.M. (1998). Shrimp diseases and current diagnostic methods. *Aquaculture* 164: 201-220.

Prayitno S.B. & Lacthford J.W. (1995). Experimental infections of crustaceans with luminous bacteria related to *Photobacterium* and *Vibrio*. Effect of salinity and pH on infectuosity. *Aquaculture*, 132: 105-112.

Ruangpang L. & Kitao T. (1991). *Vibrio* bacteria isolated from black tiger shrimp, *Penaeus monodon* Fabricius. *J. Fish. Dis.*, 14: 383-388.

Saulnier D., Haffner P., Levy P. & Ansquer D. (2000). Experimental infection models for shrimp vibriosis studies: a review. *Aquaculture*, 191: 133-144.

Vandenbergh J., Li Y., Verdonck J., Li J., Xu H.S. & Swings J. (1998). Vibrios associated with *Penaeus chinensis* (Crustacea: Decapoda) larvae and post-larvae in Chinese shrimp hatcheries. *Aquaculture*, 169: 121-132.