

Episodio d'infezione da *Pseudomonas fluorescens* in storione siberiano (*Acipenser baeri*) d'allevamento

Pseudomonas fluorescens infection in farmed Siberian sturgeon (Acipenser baeri)

**Rinaldo Brunetti¹, Filippo Gasparri²,
Stefano Marturano³, Marino Prearo^{1*}**

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Via Bologna, 148 – 10154 Torino;

² Skretting Italia, Hendrix S.p.A., Fraz. S. Zeno – 37060 Mozzecane (VR);

³ Studio Acqua Nostra, Via Bareggio 12/411 – 20090 Cusago (MI)

RIASSUNTO - Nel corso dell'estate 2005 si è verificato un focolaio da *Pseudomonas fluorescens* in un allevamento di storione siberiano (*Acipenser baeri*) situato nel Nord Italia, con una mortalità del 40% circa.

I soggetti colpiti erano esemplari giovani, della taglia di circa 10 grammi, allevati in vasche circolari interne di circa 15 m³, dotate di ossigenazione automatica, con una temperatura dell'acqua attorno ai 22-24°C. All'esame necroscopico i pesci presentavano lesioni cutanee in prossimità della regione perianale; all'apertura della cavità corporea si evidenziava la distensione della vescica natatoria e la presenza di un'enterite emorragica, particolarmente evidente nel tratto terminale dell'intestino. L'esame colturale, effettuato da rene e milza, ha dato esito positivo, con crescita di colonie in purezza su terreni di primo isolamento. La successiva caratterizzazione fenotipica e biochimica del germe ha consentito di identificarlo come *P. fluorescens*.

La terapia si è basata sull'utilizzo di mangime medicato con ossitetraciclina alla dose di 75 mg/kg di p.v. per 10 giorni con remissione completa della sintomatologia.

L'isolamento di *P. fluorescens* in *A. baeri* rappresenta una nuova segnalazione tra le patologie di origine batterica che colpiscono questa specie ittica, non essendo nota altra comunicazione sul territorio nazionale.

SUMMARY – During the summer of 2005, an outbreak of *Pseudomonas fluorescens*, with a mortality rate of about 40%, was isolated in farmed Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*) in North Italy.

The affected subjects were young specimens, about 10 grams in size, bred in internal circular tanks of about 15 m³, equipped with automatic oxygenation, having a water temperature of about 22-24°C. Externally, fish presented cutaneous lesions close to the perianal region. Necroscopic examination showed a distension of the swim bladder and the presence of hemorrhagic enteritis, especially evident in the terminal tract of the intestine. The cultural examination, carried out on kidney and spleen, was positive, with pure colonies, and successive phenotypic and biochemical characterization allowed us to identify the germ as *P. fluorescens*.

The therapy was based on the use of food medicated with oxytetracycline at a dose of 75 mg/kg of weight for 10 days with complete remission of the symptoms.

The isolation of *P. fluorescens* in *A. baeri* represents a new pathology of bacterial origin affecting this species since there have not been other reports in Italy.

Key words: Siberian sturgeon, *Acipenser baeri*, Bacterial disease, Pseudomonosis, *Pseudomonas fluorescens*.

* Corresponding author: c/o Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta; Area Diagnostica Generale e Sanità Animale, Laboratorio di Ittiopatologia e Acquacoltura, Via Bologna, 148 - 10154 Torino. Tel.: 011-2686251; Fax: 011-2474458; E-mail: marino.prearo@izsto.it

INTRODUZIONE

La storionicoltura in Italia ha radici relativamente recenti; infatti, i primi impianti sono sorti sul territorio lombardo alla fine degli anni settanta. Numerose sono le specie e gli ibridi che vengono allevati, sia per le loro carni sia per le uova; tra questi troviamo lo storione ladano (*Huso huso*), lo storione bianco (*Acipenser transmontanus*), lo storione russo (*Acipenser gueldenstaedti*) e lo storione siberiano (*Acipenser baeri*).

Gli Acipenseridi appartengono all'ordine degli Acipenseriformi e sono caratterizzati dalla presenza sulla cute, priva di squame, di cinque serie longitudinali di scudi ossei che conferiscono una forma pentagonale alla sezione trasversale del corpo (Tortonese, 1970).

Lo storione siberiano (*Acipenser baeri*) (Brandt, 1869) oggetto di questo studio, viene allevato in particolar modo per le carni che vengono consumate in tranci e che hanno un tipico colore bianco-grigiastro. Questa specie fu importata dalla Russia prima in Francia nel 1975 e successivamente in Italia nel 1988. Lo storione siberiano raggiunge in due anni di allevamento i 2-2,5 Kg a 15-18°C, con un indice di conversione medio compreso tra 1,8 e 2,5 nei primi 2-3 anni di allevamento, mentre negli anni successivi è decisamente superiore (fra 2 e 4) (Hochleithner & Gessner, 1999).

Pseudomonas fluorescens appartiene alla famiglia delle Pseudomonadaceae e può essere descritto come un bacillo Gram negativo, non sporigeno, ossidasi positivo, mobile per la presenza di flagelli polari e con metabolismo aerobio. Una caratteristica di *P. fluorescens* è la produzione di pigmenti che, illuminati con lunghezze d'onda di 254 nm (ultravioletto) risultano fluorescenti (Palleroni, 1984). Tale specie viene normalmente descritta come un saprofito non patogeno, che colonizza ambienti terrestri, acquatici e la superficie di molte piante. E' causa di alcune patologie nei vegetali, come ad esempio la necrosi del midollo in piante di pomodoro (Demir, 1990; Saygili *et al.*, 2004).

Nell'uomo è causa di infezioni a basso livello di virulenza, soprattutto in pazienti ospedalizzati, (Simor *et al.*, 1985), in pazienti anziani immunocompromessi (Pappas *et al.*, 2006) e provoca raramente setticemie più gravi in pazienti oncologici (Hsueh *et al.*, 1998).

P. fluorescens è normalmente presente nelle acque libere (Allen *et al.*, 1983) e viene descritto in ittiopatologia sia come un patogeno secondario che invade tessuti già danneggiati, sia come un patogeno primario a bassa virulenza (Roberts & Horne, 1978). È stato segnalato come causa di malattia in diverse specie ittiche quali tinca (*Tinca tinca*) (Ahne *et al.*, 1982), carpa (*Cyprinus carpio*) e diversi altri ciprinidi (Farkas, 1984), pescigatto (*Ictalurus melas* e *I. punctatus*) (Ghittino, 1985; Inglis *et al.*, 1993), trota fario (*Salmo trutta fario*) e trota marmorata (*S. trutta marmoratus*) (Prearo *et al.*, 2002). È noto anche come causa di ulcere cutanee in esemplari di trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*) affetti da Necrosi Pancreatica Infettiva in forma cronica (Roberts & Horne, 1978).

Scopo del presente lavoro è quello di descrivere un episodio di setticemia batterica causata da *P. fluorescens* in giovanili di storione siberiano stabulati in vasche circolari, con sintomatologia evidente ed elevata mortalità.

MATERIALI E METODI

Nel corso dell'estate 2005, sono giunti in laboratorio alcuni esemplari di storioni siberiani provenienti da un allevamento dell'Italia settentrionale in cui si stava verificando un episodio di elevata mortalità. I soggetti colpiti erano della taglia di circa 10 grammi e venivano allevati in vasche circolari di circa 15 m³, dotate di ossigenazione automatica, con una temperatura dell'acqua attorno ai 22-24°C. L'acqua di pozzo normalmente usata in questo

periodo, veniva mescolata in quantità uguali con acqua di superficie proveniente da un canale sito in prossimità dell'allevamento.

I soggetti sono stati sottoposti ad esame parassitologico a fresco per la ricerca di parassiti. All'esame necroscopico, eseguito su tutti i soggetti mediante dissezione, ha fatto poi seguito l'esame colturale di primo isolamento, eseguito tramite prelievo da rene e milza e semine su piastre di Columbia Agar addizionato con il 5% di sangue defibrinato di montone (AGS) (Microbiol). Le colonie, sviluppatasi dopo 24-48 ore di incubazione a $22 \pm 2^\circ\text{C}$, sono state sottoposte ad analisi fenotipiche (trapianto su terreni selettivi quali il Pseudomonas Isolation Agar PIA e test di motilità) e biochimiche mediante l'utilizzo di gallerie API 20NE (bioMérieux).

Una volta individuato il germe, è stato allestito l'antibiogramma secondo la metodica di Kirby-Bauer, utilizzando piastre di Muller-Hinton Agar e saggiando l'efficacia *in vitro* dei più comuni antibiotici utilizzati per i batteri Gram negativi che colpiscono i pesci.

L'approccio terapeutico si è basato sulla somministrazione di un mangime medicato con ossitetraciclina, alla concentrazione di 75 mg/kg di p.v. per 10 giorni.

RISULTATI

L'esame necroscopico ha permesso di evidenziare la presenza di lesioni cutanee in prossimità della regione perianale e di rigonfiamento della parete addominale; all'apertura della cavità corporea si è potuto notare una estrema distensione della vescica natatoria e in diversi soggetti analizzati la presenza di un'imponente enterite emorragica, particolarmente evidente nel tratto terminale dell'intestino.

L'esame parassitologico effettuato su cute e branchie è risultato negativo per tutti i soggetti esaminati.

L'esame colturale di primo isolamento è risultato positivo, con crescita di colonie già dopo circa 18 ore di incubazione a $22 \pm 2^\circ\text{C}$ su AGS.

Il germe isolato in purezza, era rappresentato da un bacillo Gram negativo, ossidasi positivo, mobile, capace di crescere a 4°C , ma non a 41°C ; la crescita su terreni selettivi (PIA), metteva in evidenza colonie azzurro-verdastre che, se sottoposte a luce ultravioletta, emettevano una caratteristica fluorescenza.

La caratterizzazione biochimica del ceppo isolato, eseguita in micrometodo (API 20NE), ha fornito i risultati evidenziati in tabella 1.

La lettura dell'antibiogramma ha mostrato *in vitro* una sensibilità intermedia ad Ossitetraciclina e Tetraciclina, mentre il germe è risultato resistente ad Acido Oxolinico, Amoxicillina, Ampicillina, Enrofloxacin, Florfenicolo, Flumequine, Sulfametazolo potenziato con Trimethoprim e Tiamfenicolo.

La terapia, effettuata mediante la distribuzione di mangime medicato per 10 giorni, ha portato alla completa remissione dei sintomi a partire dal quarto-quinto giorno di somministrazione.

La mortalità totale del presente episodio, dalla comparsa dei primi sintomi alla fine della terapia, è stata calcolata intorno al 40% circa.

Reazione	Esito
NO₃ - Riduzione dei nitrati	Negativo
TRP - Produzione di indolo dal triptofano	Negativo
GLU - Fermentazione del glucosio	Negativo
ADH - Arginina deidrolasi	Positivo
URE - Ureasi	Negativo
ESC - Idrolisi dell'esculina	Negativo
GEL - Idrolisi della gelatina	Positivo
PNPG - β -galattosidasi	Negativo
GLU - Assimilazione del glucosio	Positivo
ARA - Assimilazione dell'arabinosio	Positivo
MNE - Assimilazione del mannosio	Positivo
MAN - Assimilazione del mannitolo	Positivo
NAG - Assimilazione dell'n-acetil-glucosamina	Positivo
MAL - Assimilazione del maltosio	Negativo
GNT - Assimilazione del gluconato	Positivo
CAP - Assimilazione del caprato	Positivo
ADI - Assimilazione dell'adipato	Negativo
MLT - Assimilazione del malato	Positivo
CIT - Assimilazione del citrato	Positivo
PAC - Assimilazione del fenil-acetato	Negativo
OX - Ossidasi	Positivo
Codice identificativo finale	0157557

Tabella 1 – Caratteristiche biochimiche, valutate mediante API 20NE, del ceppo di *Pseudomonas fluorescens* isolato.

Table 1 – Biochemical characteristics (API 20NE) of *Pseudomonas fluorescens* strain.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

La Pseudomonosi da *Pseudomonas fluorescens* colpisce pesci d'acqua calda e fredda, sia dulciacquicoli che marini; la localizzazione è generalmente cutanea, soprattutto a carico di coda e pinne ed è in grado di determinare lesioni necrotiche che possono arrivare fino alla totale compromissione dell'organo (Ghittino, 1985).

Sono stati segnalati casi con elevate mortalità, anche del 90%, in avannotti di tinca, i quali presentavano lesioni emorragiche a carico della cute e della base delle pinne; inoltre è stata riscontrata la presenza di liquido ascitico in cavità peritoneale, di petecchie emorragiche a livello branchiale, epatico, splenico e lungo il tratto intestinale, con un quadro tipico di setticemia batterica (Ahne *et al.*, 1982).

In Italia, un caso di setticemia batterica da *P. fluorescens* è stata diagnosticata durante un'epizoozia in trotelle fario e marmorate allevate in un impianto montano da ripopolamento, dove la mortalità ha raggiunto il 30% circa dei soggetti colpiti, con presenza di lesioni emorragiche a carico di cute, pinne, branchie, grasso periviscerale e intestino (Prearo *et al.*, 2002).

Per quanto riguarda invece le patologie di origine batterica negli Acipenseridi, le segnalazioni risultano essere relativamente scarse, soprattutto sul nostro territorio. Alle

segnalazioni di patologie causate da *Yersinia ruckeri* in storioni siberiani (*A. baeri*) in Francia (Vuillaume *et al.*, 1987) e da *Plesiomonas shigelloides* in storione comune (*A. sturio*) in Germania in soggetti provenienti dalla Russia (Klein *et al.*, 1993), si devono aggiungere le segnalazioni italiane con isolamento di *Flexibacter columnaris* da storione bianco (*A. transmontanus*) (Dottori *et al.*, 1990) e di *Aeromonas hydrophila* da sterleto (*A. ruthenus*) (Quaglio *et al.*, 2000) e storione siberiano (Colussi *et al.*, 2005). Inoltre è stata dimostrata la suscettibilità di storione bianco ad *Edwardsiella ictaluri* tramite infezione sperimentale (Baxa *et al.*, 1990).

Nel caso in oggetto si è potuta constatare una forma setticemica, ad elevata mortalità, dove i giovani storioni presentavano una sintomatologia aspecifica.

Per le caratteristiche di patogenicità del germe in questione la causa primaria di tale episodio è da imputarsi probabilmente alla distensione della vescica natatoria, evenienza relativamente frequente nelle forme giovanili di storione, sottoposti a stress di varia natura.

L'utilizzo di acqua superficiale proveniente da un canale di alimentazione esterno, avvenuto alcuni giorni prima della comparsa delle manifestazioni cliniche, oltre a rappresentare la possibile via di entrata del germe in allevamento, ha senza dubbio sottoposto gli storioni ad un forte stress fisico, rendendoli probabilmente più vulnerabili a patologie secondarie come la Pseudomonosi.

Tale segnalazione rappresenta il primo caso di Pseudomonosi da *P. fluorescens* in storioni siberiani in Italia e costituisce un ulteriore tassello nella descrizione di quadri patologici di origine batterica che colpiscono gli Acipenseridi.

BIBLIOGRAFIA

- Ahne W., Popp W. & Hoffman R. (1982). *Pseudomonas fluorescens* as a pathogen of tench (*Tinca tinca*). *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 4: 56-57.
- Allen D.A., Austin B. & Colwell R.R. (1983). Numerical taxonomy of bacterial isolates associated with a freshwater fishery. *J. Gen. Microbiol.*, 129: 2043-2062.
- Baxa D.V., Groff J.M., Wishkovsky A. & Hedrick R.P. (1990). Susceptibility of nonictalurid fishes to experimental infection with *Edwardsiella ictaluri*. *Dis. Aquat. Org.*, 8, 2: 113-117.
- Colussi S., Gasparri F., Brunetti R., Ferrari A., Marturano S. & Prearo M. (2005). Infezione da *Aeromonas hydrophila* in storioni siberiani (*Acipenser baeri*) d'allevamento. *Ittiopatologia*, 2, 2: 105-110.
- Demir G. (1990). The occurrence of *Pseudomonas corrugate* on tomatoes in Turkey. *J. Turkish Phytopathol.*, 19: 63-70.
- Dottori M., Santi A., Ansuini A. & Carboni A. (1990). Isolation of *Flexibacter columnaris* from sturgeon (*Acipenser transmontanus*) with gill disease. *Selez. Vet.*, 31, 3: 279-284.
- Farkas J. (1984). The occurrence of *Aeromonas* and *Pseudomonas fluorescens* in the microflora of Hungarian fish species. *Halaszat.*, 30, 4: 122-124.
- Ghittino P. (1985). Tecnologia e patologia in acquacoltura. Vol. 2 Patologia. Ed. Bono, Torino: 100-102.
- Hochleithner M. & Gessner J. (1999). The sturgeon and paddlefishes (Acipenseriformes) of the world: biology and aquaculture. *AquaTech, Kitzbuehel, Austria*: 1-207.

- Hsueh P.-R., Teng L.-J., Pan H.-J., Chen Y.-C., Sun C.-C., Ho S.-W. & Luh K.-T. (1998). Outbreak of *Pseudomonas fluorescens* bacteremia among oncology patients. *J. Clin. Microbiol.*, 36, 10: 2914-2917.
- Inglis V., Roberts R.J. & Bromage N. (1993). Bacterial disease of fish. *Blackwell Science Ltd., Oxford*.
- Klein B.U., Kleingeld D.W. & Bohm K.H. (1993). First isolations of *Plesiomonas shigelloides* from samples of cultured fish in Germany. *Bull Eur. Ass. Fish Pathol.*, 13, 2: 70-72.
- Palleroni N.J. (1984). Pseudomonadaceae. Genus *Pseudomonas* Migula 1894. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Krieg N.R. & Holt J.S. Eds., Williams & Wilkins Co., Baltimore: 141-199.
- Pappas G., Karavasilis V., Christou L. & Tsianos E.V. (2006). *Pseudomonas fluorescens* infections in clinical practice. *Scand. J. Infect. Dis.*, 38, 1: 68-70.
- Prearo M., Gilli P., Mazzone P. & Ghittino C. (2002). Caso di pseudomonosi in trote fario (*Salmo trutta* ssp. *trutta*) e trote marmorate (*Salmo trutta* ssp. *marmoratus*) allevate a scopo di ripopolamento. *Boll. Soc. It. Patol. Ittica*, 33: 3-9.
- Quaglio F., Bocus R., Delgado M.L., Gamberini L., Nobile L., Minelli C., Galuppi A. & Restani R. (2000). Infezione da *Aeromonas hydrophila* in sterleti (*Acipenser ruthenus*) in un allevamento della Pianura Padana. *Boll. Soc. It. Patol. Ittica*, 28: 17-32.
- Roberts R.J. & Horne M.T. (1978). Bacterial meningitis in farmed rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, affected with chronic pancreatic necrosis. *J. Fish Dis.*, 1: 157-164.
- Saygili H., Aysan Y., Sahin F., Ustun N. & Mirik M. (2004). Occurrence of pith necrosis caused by *Pseudomonas fluorescens* on tomato plants in Turkey. *Plant Pathol.*, 53, 6: 803.
- Simor A.E., Ricci J., Lau A., Banntyne R.M. & Ford-Jones L. (1985). Pseudobacteremia due to *Pseudomonas fluorescens*. *Pediatr. Infect. Dis.*, 4: 508-512.
- Tortonese E. (1970). Fauna d'Italia, Vol. X. Osteichthyes – Pesci ossei (parte prima). Ed. Calderini, Bologna: 75-86.
- Vuillaume A., Brun R., Chene P., Sochon E. & Lesel R. (1987). First isolation of *Yersinia ruckeri* from sturgeon, *Acipenser baeri* Brandt, in South West of France. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 7, 1: 18-19.