

**Aspetti microbiologici e anatomo-istopatologici  
in corso di flavobatteriosi in dentici (*Dentex dentex*)  
d'allevamento**

*Microbiological and anatomo-histopathological aspects during  
an outbreak of flavobacteriosis in farmed common dentex  
(Dentex dentex)*

**Monique Mancuso<sup>1\*</sup>, Battesimo Macrì<sup>2</sup>, Salvatore Monaco<sup>2</sup>, Renata Zaccone<sup>1</sup>,  
Maria Luana Paradiso<sup>2</sup>, Gabriella Caruso<sup>1</sup>, Fabio Marino<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Istituto per l'Ambiente Marino Costiero (IAMC) - CNR Sezione di Messina.  
Spianata S. Raineri, 86 - 98122 Messina.

<sup>2</sup> Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria, Università degli Studi di Messina,  
Polo Universitario Annunziata - 98168 Messina.

---

**RIASSUNTO** - Le Flavobatteriosi sono malattie infettive emergenti in maricoltura, soprattutto nel bacino del Mediterraneo, caratterizzate dalla comparsa di ulcere ed erosioni cutanee, accompagnate da cachessia e ritardo della crescita. Tra le specie marine, le più sensibili all'infezione si sono dimostrate le spigole e le orate e, più recentemente, i dentici allevati in Sardegna. Gli Autori riportano i quadri descrittivi caratterizzanti un focolaio spontaneamente occorso in un impianto siciliano per l'ingrasso off-shore di dentici (*Dentex dentex*). I soggetti campionati nel Febbraio 2003 sono stati sottoposti ad esame microbiologico ed istopatologico. Le lesioni documentate sui soggetti malati erano riferibili ad erosioni cutanee, accompagnate da depigmentazione e/o emorragie, ulcere talora profonde sino ad interessare la muscolatura sottostante ed erosioni delle pinne e della coda. Istologicamente, le ulcere cutanee apparivano approfondirsi nel derma sottostante; quest'ultimo era caratterizzato da necrosi, infiltrato parvicellulare e dalla presenza di numerosi batteri filamentosi. L'entità del focolaio e la grave sintomatologia osservata nei soggetti colpiti costituisce un'ulteriore conferma della pericolosità delle infezioni da flavobatteri per la maricoltura mediterranea, nonché del fatto che attualmente sia uno dei principali fattori limitanti lo sviluppo dell'allevamento del dentice.

**SUMMARY** - *Flavobacteriosis are emerging infectious diseases in marine fish aquaculture, above all in the Mediterranean basin, characterized by cutaneous ulcers and erosions with cachexia and delayed growth, rarely lethal for the affected specimens. Among marine fish species, seabream and seabass are the most sensitive to the infection and recently also common dentex farmed in Sardinia. Authors describe the features characterizing a spontaneous outbreak occurred in a Sicilian off-shore farm of common dentex (Dentex dentex). On February 2003 infected specimens were sampled and microbiological and histopathological assays were performed. Cutaneous changes of diseased specimens were erosions with depigmentation and/or haemorrhages, ulcers deepened beneath the musculature, fin and caudal erosions. By the histological point of view, subcutaneous tissue was characterized by necrosis, parvicellular infiltration and several filamentous bacteria. Extent of focus and severity of symptoms confirmed the dangerous potential of flavobacterial infections for the Mediterranean mariculture and a limiting factor in common dentex farming development.*

**Key words:** Flavobacteriosis, Common dentex, *Dentex dentex*, Histopathology

---

\* 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

Le Flavobatteriosi sono malattie infettive dei teleostei emergenti in maricoltura mediterranea. La presenza di questa malattia in Europa è stata dimostrata in Scozia in sogliola (*Solea solea*) affetta da “Black patch necrosis” (Campbell & Buswell, 1982), il cui agente eziologico venne successivamente identificato da Bernadet *et al.* (1990) come *Flexibacter maritimus*.

Più tardi questo patogeno è stato isolato in diverse specie ittiche allevate in Spagna (Alsina & Blanch, 1993; Pazos *et al.*, 1993; Cepeda & Santos, 2002), in Corsica (Francia) (Bernadet *et al.*, 1994) ed anche in Italia in spigole, orate e dentici allevati in Sardegna (Salati *et al.*, 1999; 2003).

*Tenacibaculum maritimum* (sin. *Flexibacter maritimus*), patogeno opportunista, è l’agente della flavobatteriosi marina. Appartenente alla famiglia delle Flavobacteriaceae, è un bastoncello allungato, Gram negativo, mobile per scivolamento (gliding), aerobio stretto, alofilo, formante colonie pigmentate di giallo o arancio. La malattia, sovrapponibile alla malattia colonnare da *Flavobacterium columnare*, si sviluppa in ambiente marino, è caratterizzata dalla comparsa di ulcere ed erosioni cutanee, accompagnata da cachessia e ritardo della crescita, talvolta con esito letale (Cepeda & Santos, 2002).

Al fine di apportare un ulteriore contributo casistico e di sottolineare quanto lo sviluppo di rapide tecniche diagnostiche possa essere un indispensabile strumento per la profilassi della malattia, gli Autori riportano i quadri descrittivi caratterizzanti un focolaio in un impianto siciliano per l’ingrasso off-shore di dentici (*Dentex dentex*).

## MATERIALI E METODI

Nel Febbraio 2003, 30 esemplari di dentice (*D. dentex*), sono stati prelevati presso un allevamento siciliano che pratica l’ingrasso di questa specie in gabbie off-shore. I pesci avevano un peso medio di 35 g. ed erano mantenuti in gabbie con una densità di popolazione di 7,5 kg/m<sup>3</sup>, temperatura dell’acqua intorno ai 15° C e salinità 37‰. In tale periodo l’impianto aveva subito notevoli perdite economiche riferibili ad un tasso di mortalità pari al 20%. Dopo campionamento, i soggetti sono stati trasportati immediatamente in laboratorio dove sono stati effettuati la necropsia ed il prelievo di campioni per l’esame batteriologico e istologico. All’esame necroscopico si osservavano ulcere cutanee diffuse su tutta la superficie corporea, un’assenza di lesioni microscopicamente evidenti a carico degli organi interni (Foto 1).

Campioni di muco branchiale e cutaneo, prelevato nelle sedi con evidenti lesioni, sono stati strisciati su vetrino successivamente colorato con Blu di metilene, Gram, May Grünwald-Giemsa e Diff-quick, al fine di evidenziare la caratteristica morfologia filamentosa dei batteri (Cepeda *et al.*, 2004).

Per l’esame batteriologico sono stati prelevati campioni di cute, branchie, fegato, sangue, rene, milza, seminati su piastre di Marine Agar 2216 E (Oxoid), e Anacker and Ordal Agar (AOA) modificato per batteri marini (Hikida *et al.*, 1979; Pazos *et al.*, 1996). Le piastre di AOA sono state incubate a 24° C per 48-72 ore.

Le colonie cresciute su AOA sono state identificate utilizzando prove morfologiche (Gram), fenotipiche (crescita a differenti temperature e salinità, assorbimento del Rosso Congo, test del K-OH al 20%, sensibilità all’agente vibriostatico O/129) e biochimiche (catalasi, ossidasi, etc.). Sono stati infine utilizzati 2 sistemi di identificazione: API 20 E (Biomerieux) e Biolog Gn (Cepeda *et al.*, 2004; Frette *et al.* 2004) incubati a 22° C per 48-

72 ore; quest'ultimo è utilizzato per studiare la capacità del ceppo isolato di crescere utilizzando 95 differenti fonti di Carbonio.

Per la conferma della specie *T. maritimum*, in immunofluorescenza indiretta, una sospensione di cellule batteriche è stata filtrata su filtri di policarbonato (0.22 µm) (Osmonics Inc.). Dopo trattamento con gelatina al 2% in PBS, il filtro è stato incubato al buio per 30' con siero policlonale anti-*Flexibacter maritimus* (Microtech diluito 1:80 in PBS) e successivamente per 30' con anti-rabbit IgG coniugata con isotiocianato di fluoresceina (diluita 1:160 in PBS). Dopo montaggio su vetrino, si è proceduto all'osservazione al microscopio ad epifluorescenza, adoperando i filtri specifici per FITC (BP 450-490, FT 510, LP 520).

Su 15 pesci è stato eseguito l'esame istologico. I campioni di tutti gli organi e tessuti venivano fissati 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 si evidenziava la presenza di erosioni cutanee, accompagnate da depigmentazione e/o emorragie ed erosioni delle pinne e della coda. Talora, le ulcere apparivano profonde sino ad interessare la muscolatura sottostante. Le emorragie erano solitamente puntiformi, sebbene in alcuni soggetti apparissero sotto forma di soffiusioni. All'esame macroscopico, gli organi della cavità celomatica non presentavano alcuna modificazione patologica.

Da un esame preliminare del muco branchiale e cutaneo, si è potuta osservare, previa colorazione con Gram e Blu di metilene la tipica morfologia, caratterizzata dalla forma allungata, delle Flavobacteriaceae (Foto 2). L'esame colturale ha confermato la presenza di colonie pigmentate giallo-arancio rizoidi su Anacker and Ordal modificato, isolate sia da campioni di cute e branchie che dal sangue, indicanti la presenza di setticemia batterica.

I test biochimici hanno portato all'identificazione del genere *Flexibacter*. I ceppi inoltre erano positivi al Rosso Congo e al test O/129 e crescevano in alte percentuali di NaCl (3 e 6%) e differenti temperature (4, 15, 25, 35° C).

Istologicamente, le ulcere cutanee apparivano talvolta approfondirsi nel derma sottostante; quest'ultimo era caratterizzato da necrosi, infiltrato parvicellulare e dalla presenza di numerosi batteri filamentosi. La presenza di batteri filamentosi era evidente anche nell'ambito della matrice necrotica che in alcuni casi sostituiva completamente il derma (Foto 3).

L'immunofluorescenza indiretta ha permesso l'osservazione di cellule filamentose e fluorescenti con l'anticorpo specifico, confermando l'appartenenza alla specie *Tenacibaculum maritimum* (*Flexibacter maritimus*).

I ceppi studiati hanno evidenziato un lento metabolismo batterico nei confronti dei test enzimatici. La maggior parte dei ceppi utilizzava i seguenti substrati: Tween 40, Tween 80, destrina, N-acetil-D-galattosamina, D-Arabitolo, Cellobiosio, α-D-glucosio e Sorbitolo. Scarsa attività nei confronti dei carboidrati complessi e degli altri substrati di crescita con il sistema Biolog GN.

Bernadet *et al.* (1994) studiando il profilo enzimatico di ceppi di *Flexibacter maritimus* isolati da specie ittiche (*Solea solea*) tramite l'API-ZYM, hanno riscontrato delle similitudini enzimatiche tra tutti i ceppi studiati con alte attività proteolitiche, ma scarsa attività nei confronti dei carboidrati. Tuttavia tale metodo fornisce informazioni sul metabolismo batterico, ma non è utilizzabile come chiave diagnostica (Bernadet & Keroualt, 1989).

## DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

La saturazione del mercato da parte delle specie ittiche consolidate nella maricoltura mediterranea, ha progressivamente e inevitabilmente portato alla ricerca di nuovi sbocchi commerciali spesso identificati dai produttori nelle specie innovative. Il dentice rappresenta una delle principali sfide in tal senso, costituendo un'appetibile prodotto per il consumatore, data la prelibatezza delle sue carni e rappresenta un interessante investimento per il produttore, considerate le dimensioni ragguardevoli e l'elevato indice di conversione dell'alimento. E' una specie ormai relativamente poco comune nei nostri mari, per cui la disponibilità sul mercato di prodotto fresco si può garantire solo attraverso la riproduzione artificiale e l'allevamento di questa specie ittica.

Lo sviluppo dell'allevamento di una nuova specie però non può esulare dallo studio e dal superamento dei suoi fattori limitanti. Nel caso del dentice, le principali problematiche sono da riferire all'alimentazione, al management e alle patologie. Tra queste ultime, in accordo anche con i dati presenti in letteratura (Salati *et al.*, 2003), le flavobatteriosi giocano sicuramente un ruolo importante, soprattutto se in concomitanza con altre malattie o fattori stressogeni. La comparsa della malattia in febbraio conferma la stagionalità dell'infezione e il ruolo sicuramente predisponente delle basse temperature. Un fattore verosimilmente predisponente lo stato di malattia potrebbe essere ricercato nell'alimentazione, totalmente basata sul fresco, considerata la riluttanza del dentice verso i mangimi pellettati.

L'immissione di alimento fresco nell'acqua delle gabbie potrebbe apportare microrganismi che, anche se non direttamente patogeni, possono modificare l'omeostasi dell'ambiente e favorire infezioni secondarie. L'entità del focolaio e la grave sintomatologia caratterizzante i soggetti colpiti nel caso riportato, costituisce un'ulteriore conferma della pericolosità delle infezioni da flavobatteri per la maricoltura mediterranea, nonché del fatto che attualmente siano uno dei principali fattori limitanti lo sviluppo dell'allevamento del dentice.

Rimane da chiarire se esistono differenze nella patogenicità dei diversi ceppi e, di conseguenza, verso quali occorre sviluppare trattamenti immunizzanti.

## BIBLIOGRAFIA

Alsina M. & Blanch A.R. (1993). First isolation of *Flexibacter maritimus* from cultivated turbot (*Scophthalmus maximus*). *Bull. Eur. Ass. Fish. Pathol.*, 13: 157-160.

Bernadet J.F., Campbell A.C. & Buswell J.A. (1990). *Flexibacter maritimus* is the agent of "black patch necrosis" in *Dover sole* in Scotland. *Dis. Aquat. Org.*, 8: 233-237.

Bernadet J.F. & Keroualt B. (1989). Phenotypic and genomic studies of *Cytophaga psychrophila* isolated from diseased rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in France. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 1796-1800.

Bernadet J.F., Keroualt B. & Michel C. (1994). Comparative study on *Flexibacter maritimus* strains isolated from farmed sea bass (*Dicentrarchus labrax*) in France. *Fish Pathol.*, 29, 2: 105-111.

Campbell A.C. & Buswell J.A. (1982). An investigation into the bacterial aetiology of "Black patch necrosis" in *Dover sole* (*Solea solea* L.). *J. Fish Dis.*, 5: 495-508.

Cepeda C., García-Márquez S. & Santos Y. (2004). Improved growth of *Flavobacterium psychrophilum* using a new culture medium. *Aquaculture*, 238: 75-82.

- Cepeda C. & Santos Y. (2002). First isolation of *Flexibacter maritimus* from farmed Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup) in Spain. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 22, 6: 388-392.
- Frette L., Jorgensen N.O.G., Irming H. & Kroer N. (2004). *Tenacibaculum skagerrakense* sp. nov., a marine bacterium isolated from the pelagic zone in Skagerrak, Denmark. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 54: 519-524.
- Hichida M., Wakabayashi H., Egusa S. & Masumura K. (1979). *Flexibacter* sp., a gliding bacterium pathogenic to some marine fishes in Japan. *Bull. Jap. Soc. Scien. Fisheries*, 45: 421-428.
- Pazos R., Santos Y., Macias, A.R. Nùñez J. S. & Toranzo A.E. (1996) Evaluation of media for the successful culture of *Flexibacter maritimus*. *J. Fish Dis.*, 19: 193-197.
- Pazos R., Santos Y., Nùñez J.S. & Toranzo A.E. (1993). Increasing occurrence of *Flexibacter maritimus* in the marine aquaculture of Spain. *FHS Newsletter*, 21: 1-2.
- Salati F., Viale I. & Meloni A. (1999). L'acquacoltura e lo stato sanitario dei pesci allevati in Sardegna. *Boll. Soc. It. Patol. Ittica*, 26, 3-9.
- Salati F., Meloni A., Cubadda C. & Viale I. (2003). Prove di allevamento e patologie del dentice (*Dentex dentex* L.) in Sardegna. *Boll. Soc. It. Patol. Ittica*, 38: 13-19.



Foto 1: *Dentex dentex*: affetti da ulcere cutanee ed emorragie.  
*Photo 1: Dentex dentex affected by skin ulcer and haemorrhages.*

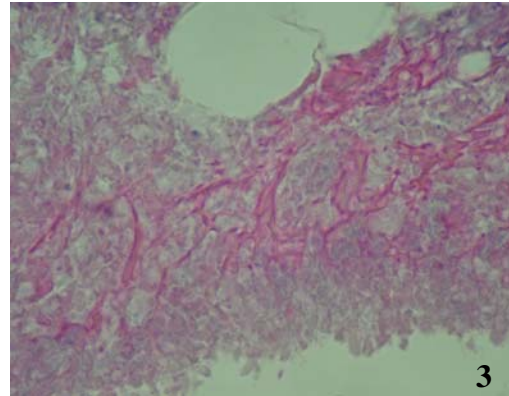
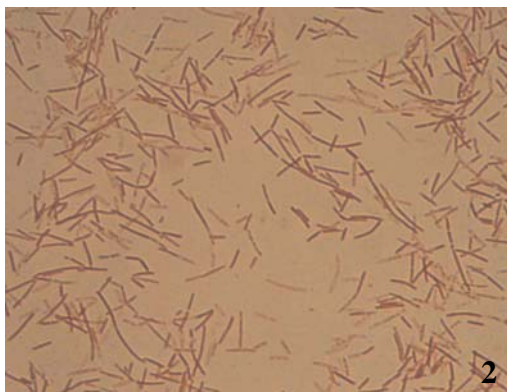


Foto 2: *Tenacibaculum maritimum* colorato con la tecnica di Gram.  
*Photo 2: Tenacibaculum maritimum by Gram stain .*

Foto 3: *Dentex dentex*: sezione istologica di un'erosione cutanea mostrante il derma caratterizzato da una matrice necrotica in cui erano immersi numerosi batteri filiformi (EE 20X).

*Photo 3: Dentex dentex: histological section of skin ulcer showing subcutaneous tissue characterized by a necrotic matrix in which several filamentous bacteria were immersed (EE 20X).*