

**Contributo pratico per la diagnosi di
Flavobacterium psychrophilum in episodi di infezione
nella trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*)**

*Practical contribution for the diagnosis of
Flavobacterium psychrophilum in outbreaks
in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss)*

**Alessandro Mangiarotti*, Cristian Salogni, Nicola De Simone,
Giovanni Loris Alborali**

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Via Bianchi, 9 - 25124 Brescia

RIASSUNTO - *Flavobacterium psychrophilum* è l'agente eziologico della Rainbow Trout Fry Syndrome e della Bacterial Cold Water Disease. Sebbene tale batterio sia stato segnalato in Italia nel 1992 ancora oggi sono disponibili pochi studi completi sulla diagnosi di laboratorio. Questo lavoro vuole offrire un contributo pratico per la conferma diagnostica di flavobatteriosi. Nel periodo compreso tra il 2003 e il 2004 sono stati seguiti quattordici episodi di infezione da *F. psychrophilum* in allevamenti di trota iridea. Da ogni episodio sono stati individuate le partite di avannotti di trote con mortalità sospetta e prelevati soggetti che mostravano sintomi. Tali soggetti sono stati sottoposti all'esame anatomopatologico e quelli che evidenziavano una spiccata splenomegalia selezionati per gli esami colturali. Ai fini diagnostici sono state prelevate le milze dei soggetti infetti, sottoposte a prelievo per l'esame colturale ed utilizzate per ottenere strisci e sezioni d'organo. I test di laboratorio eseguiti sono stati l'immunofluorescenza su sezione e striscio di milza, gli esami microscopico e colturale con l'identificazione dei batteri, ottenuta mediante l'osservazione delle caratteristiche morfologiche delle colonie e la sieroaagglutinazione rapida. A tale proposito è stato utilizzato un siero policlonale di coniglio anti-*F. psychrophilum* precedentemente allestito e testato. I risultati ottenuti dimostrano l'utilità dei test sierologici e in particolare dell'immunofluorescenza, anche se l'esistenza di una notevole varietà di sierotipi di *F. psychrophilum* richiede ulteriori approfondimenti nell'impiego del siero allestito.

SUMMARY - *Flavobacterium psychrophilum* is the aetiological agent of Rainbow Trout Fry Syndrome and Bacterial Cold Water Disease. Even if this bacterium has been reported in Italy in 1992 yet are available only few complete studies concerning the laboratory diagnosis. This work offers a practical contribution to the diagnosis of flavobacteriosis. Fourteen outbreaks of *F. psychrophilum* in rainbow trout farms have been studied between 2003-2004. From every outbreak have been found out those fry lots with suspect mortality and taken those who showed symptoms. These fish have been examined by necroscopy and selected for cultural tests those who showed a remarkable splenomegaly. For diagnostics purposes, the spleens of the infected subjects have been taken and used for cultural test and to obtain spleen scrapes and sections upon slides. The laboratory tests performed have been immunofluorescence on spleen scrapes and sections, microscopic and cultural tests and bacteria identification by morphological characteristics of their colonies and by seroaagglutination. For this purpose has been prepared, tested and used a rabbit polyclonal anti *F. psychrophilum* serum. Results show that serological tests are useful and mostly immunofluorescence even if the existence of a lot of *F. psychrophilum* serotypes need further examinations on the serum used.

Key words: *Flavobacterium psychrophilum*, Diagnosis, Immunofluorescence, Seroagglutination.

* Corresponding Author: c/o Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Via A. Bianchi, 9 - 25124 Brescia. Tel.: +39 030 2290216; Fax: +39 030 2290552; E-mail: ittiopatologia@bs.izs.it

INTRODUZIONE

Flavobacterium psychrophilum è l'agente eziologico della Rainbow Trout Fry Syndrome (RTFS) e della Bacterial Cold Water Disease (BCWD) ed è un batterio Gram negativo sottile, lungo e flessuoso con dimensioni di circa 0,3-0,7 x 2-7 µm, ma può raggiungere anche i 10-40 µm per alcune forme filamentose.

Il quadro anatomopatologico è caratterizzato da melanosi cutanea e spiccata splenomegalia nella RTFS, mentre i segni clinici più evidenti della BCWD sono le ulcere cutanee visibili nella regione del peduncolo caudale (Holt, 1987; Baudin-Laurencin *et al.*, 1989; Lorenzen *et al.*, 1991; Rangdale, 1995).

F. psychrophilum colpisce numerose specie ittiche tra cui molti salmonidi. Tra le specie più sensibili troviamo il salmone coho (*Oncorhynchus kisutch*), la trota iridea (*O. mykiss*) e l'ayu (*Plecoglossus altivelis altivelis*) (Amos, 1985; Wakabayashi *et al.*, 1994).

L'infezione da *F. psychrophilum* si trasmette sia per via orizzontale sia per via verticale (Lorenzen, 1994; Ekman *et al.*, 1999; Madetoja *et al.*, 2002), sebbene alcuni autori non siano d'accordo con quest'ultima modalità (Dalsgaard & Madsen, 2002).

La mortalità, tra gli avannotti di salmonidi è variabile tra il 20 e il 60% (Holt, 1987; Lorenzen & Karas, 1992). In altre specie ittiche la patologia è significativamente meno severa.

In Italia la diffusione di *F. psychrophilum* è stata descritta da Sarti *et al.*, nel 1992, anche se sono disponibili pochi studi completi sulla diagnosi di laboratorio dei ceppi italiani.

Questo lavoro vuole portare un contributo alla diagnostica affiancando l'immunofluorescenza e le tecniche sierologiche alle tradizionali tecniche basate sulle caratteristiche morfologiche, senza rinunciare a rapidità di esecuzione e specificità.

MATERIALI E METODI

Nel periodo compreso tra il 2003 e il 2004 sono stati seguiti quattordici episodi di infezione da *F. psychrophilum* in allevamenti di trota iridea.

Da ogni episodio sono stati prelevati avannotti di trote iridea infetti che mostravano sintomi quali melanosi ed esoftalmo e che, sottoposti ad esame anatomopatologico, evidenziavano una spiccata splenomegalia. Ai fini diagnostici sono state prelevate le milze dei soggetti infetti e sottoposte agli esami microscopico, colturale e d'immunofluorescenza indiretta su striscio e sezione d'organo.

La specificità del siero iperimmune, (policlonale di coniglio ottenuto da ceppo di *F. psychrophilum* ATCC 49510), utilizzato per l'immunofluorescenza e la sieroaagglutinazione è stata valutata con ceppi batterici quali *Aeromonas hydrophila*, *A. sobria*, *A. salmonicida*, *Yersinia ruckeri* e *Lactococcus garvieae* e ceppi di *F. columnare* (ATCC 49512) e di *F. branchiophilum* (ATCC 35035). Allo scopo di eliminare i fenomeni di autoagglutinazione le sospensioni batteriche di *F. psychrophilum*, in soluzione fisiologica alla concentrazione di circa 10⁹ ufc/ml, sono state inattivate col calore, ponendole a bagnomaria a 56° C per 15 minuti. Quindi, per l'attuazione classica del test, sono stati messi in contatto e miscelati su vetrino 10 µl di siero diluito 1:20, o soluzione fisiologica sterile per il controllo, con 10 µl di sospensione batterica.

Esame microscopico

Le milze sono state utilizzate per l'allestimento di strisci su vetrino e successivamente fissati al calore. I vetrini colorati con la colorazione di Gram o con colorazione semplice con fucsina diluita (1%) sono stati osservati al microscopio ottico con obiettivo ad immersione

(100 x).

Esame colturale

Dalle milze infette è stata effettuata la semina su terreni agarizzati specifici quali l'Anacker Ordal (Anacker & Ordal, 1959) e il Triptone Yeast Extract Salts (TYES), (Holt, 1987). Per la crescita di *F. psychrophilum* è stata necessaria un'incubazione di 3-4 giorni a 15° C.

Immunofluorescenza indiretta

Dalle milze sono state allestite impronte su vetrino e sezioni d'organo. I vetrini, una volta fissati in acetone al 80% per una notte a -20° C, sono stati sottoposti alla tecnica di immunofluorescenza indiretta. L'immunocolorazione è stata effettuata utilizzando come siero primario il siero policlonale di coniglio anti *F. psychrophilum* diluito 1:10. I vetrini, dopo incubazione in camera umida alla temperatura di 37° C per 30 minuti, sono stati lavati con tampone fosfato (pH 7,2) e asciugati. Successivamente è stato disposto il siero anticonglio coniugato con fluoresceina isotiocianato. Dopo una seconda incubazione a 37° C, lavaggio con tampone fosfato e colorazione con Blu di Evans per 15 secondi, è stata effettuata la lettura al microscopio a fluorescenza (emissione UV, λ 540 nm).

RISULTATI

L'esame anatomopatologico ha sempre evidenziato: esoftalmo, melanosi cutanea, anemia branchiale, epatica e renale, ascite e soprattutto ipertrofia splenica (Figura 1). Tali lesioni sono riferibili alla forma viscerale dell'infezione da *F. psychrophilum* nota come Rainbow Trout Fry Syndrome. Meno frequenti sono stati, negli stessi soggetti, i rilievi di erosione cutanea e delle pinne.

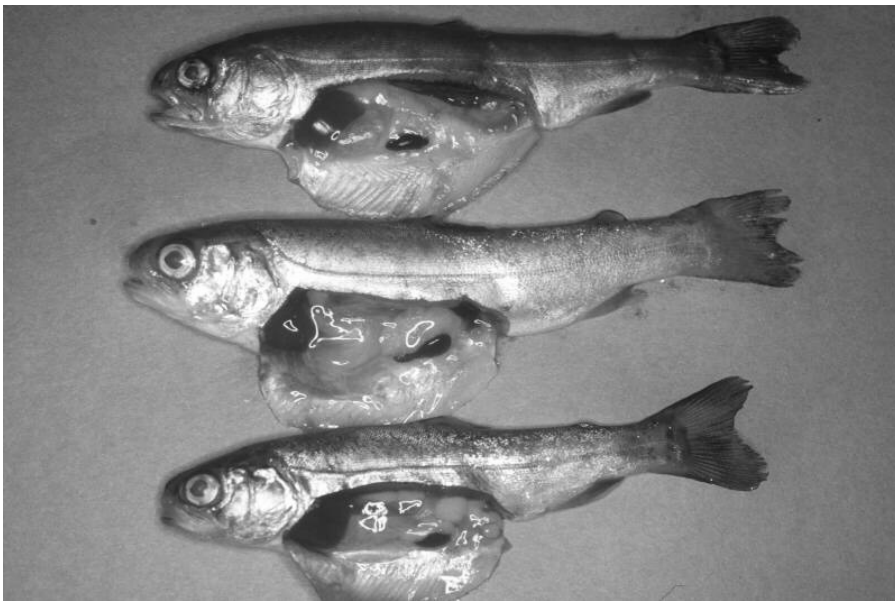


Figura 1 - lesioni da RTFS.
Figure 1 - RTFS lesions.

Esame microscopico

All'osservazione microscopica degli strisci di milza infetta sono stati evidenziati bastoncini Gram negativi sottili, lunghi e flessuosi di dimensioni di circa 0,3-0,7 x 2-7 μm .

Esame colturale

Le colonie batteriche, visibili dopo almeno 72 ore di incubazione a 15° C, sia su Anacker Ordal che su TYES, si sono presentate di colore giallo brillante e di forma rotondeggiante. La presenza e l'entità della sciamatura, evidenziata sporadicamente, è stata ricondotta al grado variabile di umidità del terreno colturale. Le prove biochimiche, effettuate secondo diversi autori, hanno dato risultati controversi e deludenti.

Immunofluorescenza indiretta

La positività è stata evidenziata al microscopio dalla presenza di bacilli fluorescenti raggruppati a focolaio (Figura 2).

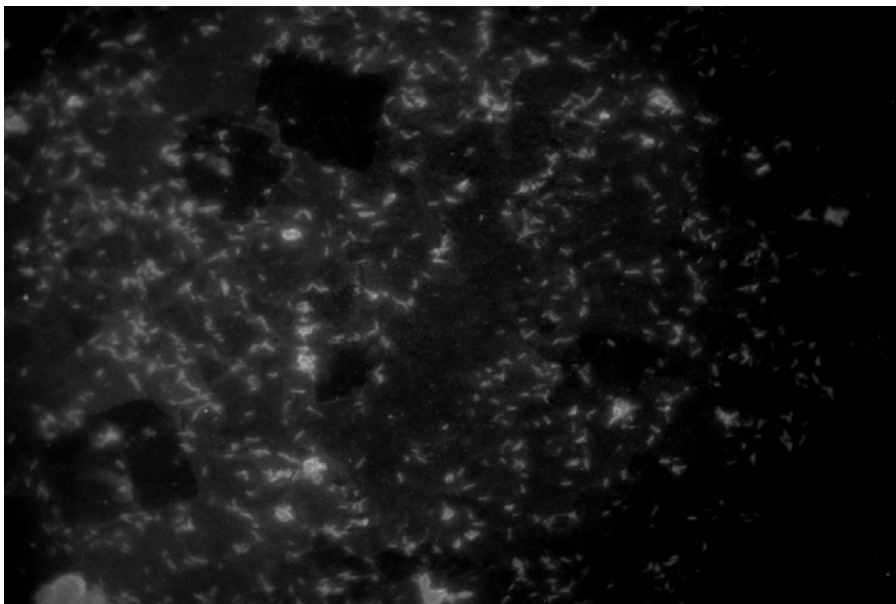


Figura 2 - Immunofluorescenza indiretta su impronta di milza.
Figure 2 - Indirect immunofluorescence on spleen touch.

Sieroagglutinazione

L'assenza di reazioni di agglutinazione con i ceppi batterici non appartenenti alla specie *F. psychrophilum* ha evidenziato la specificità del siero allestito.

I risultati della SA sui ceppi di *F. psychrophilum* sono invece riportati nella tabella corrispondente (Tabella 1).

| CEPPO-ANNO | SPECIE | ORGANO | SIERO 1:20 |
|-------------------|--------------|---------------|------------|
| 51476 (I) - 2003 | trota iridea | milza | +++ |
| 51477 (I) - 2003 | trota iridea | milza | ++ |
| 53151 (I) - 2003 | trota iridea | milza/rene | ++ |
| 59567 (I) - 2003 | trota iridea | milza/rene | ++ |
| 67960 (I) - 2003 | trota iridea | milza | ++ |
| 83636 (I) - 2003 | trota iridea | milza | ++ |
| 83642 (I) - 2003 | trota iridea | milza | ++ |
| 314112 (I) - 2003 | trota iridea | milza | + |
| 11711 (I) - 2004 | trota iridea | milza | - |
| 16338 (I) - 2004 | trota iridea | milza/muscolo | ++ |
| 19290 (I) - 2004 | trota iridea | milza | - |
| 19294 (I) - 2004 | trota iridea | milza | ++ |
| 20184 (I) - 2004 | trota iridea | milza/muscolo | - |
| 26825 (I) - 2004 | trota iridea | milza | + |

Legenda: (I) = ceppo isolato nel Laboratorio di Ittiopatologia (IZSLER) di Brescia/ *strain isolated at Laboratorio di Ittiopatologia (IZSLER) in Brescia*

- = agglutinazione assente/*absent agglutination*
- + = agglutinazione sufficiente/*sufficient agglutination*
- ++ = agglutinazione buona/*good agglutination*
- +++ = agglutinazione molto buona/*very good agglutination*

Tabella 1 - Sieroagglutinazione rapida su ceppi di *Flavobacterium psychrophilum*.
Table 1 - Rapid seroagglutination on Flavobacterium psychrophilum strains.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Le tecniche tradizionali di diagnosi di Flavobatteriosi basate sull'osservazione delle caratteristiche morfologiche e tintoriali del batterio, sebbene trovino una buona e facile applicazione in campo pratico, non risultano essere comunque sufficientemente sensibili e specifiche. L'isolamento dei ceppi in purezza di *F. psychrophilum* su terreni colturali specifici, è un passaggio fondamentale al fine di poter effettuare studi sulle caratteristiche dei ceppi batterici stessi. Nel presente lavoro l'allestimento di un siero policlonale anti-*F. psychrophilum* si è dimostrato utile per l'impiego di tecniche diagnostiche alternative all'esame microscopico classico. Tra queste l'immunofluorescenza indiretta, su sezione o impronta d'organo, appare di elevata specificità, di esecuzione rapida e utilizzabile come tecnica diagnostica di routine. Anche la sieroagglutinazione rapida, dopo inattivazione tramite calore delle colture batteriche, ha messo in evidenza una soddisfacente capacità del siero allestito di identificare *F. psychrophilum* (pur considerando la presenza di ceppi scarsamente reattivi), dimostrandosi così più affidabile rispetto alle prove biochimiche che, nel caso dei flavobatteri, risultano scarsamente significative.

BIBLIOGRAFIA

- Amos K. (1985). Procedures for the detection and identification of certain fish pathogens. 3rd edn. *Fish Health Section, American Fishery Society, Corvallis, Oregon*.
- Anacker R.L. & Ordal E.J. (1959). Studies on the myxobacterium *Chondrococcus columnaris* I. Serological typing. *J. Bacteriol.*, 78: 25-32.
- Baudin Laurencin F., Castric J.C., Vigneulle M. & Tixerant G. (1989). La myxobacteriose viscérale de la troute arc-en-ciel *Salmo gairdneri*: une forme nouvelle de la maladie de l'eau froide a *Cytophaga psychrophila*. *Bull. Acad. Vet. Fr.*, 62: 147-157.
- Dalsgaard I. & Madsen L. (2002). Presence of *Flavobacterium psychrophilum* on eggs of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Proceedings 4th International symposium on Aquatic animal Health. September 1-5/2002, New Orleans, Louisiana, USA*.
- Ekman E., Borjeson H. & Johansson N. (1999). *Flavobacterium psychrophilum* in Baltic *Salmo salar* brood fish and their offspring. *Dis. Aquat. Org.*, 37: 159-163.
- Holt R.A. (1987). *Cytophaga psychrophila*, the causative agent of BCWD in salmonid fish. *Ph.D. Thesis, Oregon State University, Corvallis*.
- Lorenzen E. (1994). Study on *Flexibacter psychrophilum* in relation to rainbow trout fry syndrome. *PhD Thesis, Royal Veterinary and Agricultural University, Copenhagen*.
- Lorenzen E., Dalsgaard I., From J., Hansen E.M., Horlyck V., Korsholm H., Møllergaard S. & Olesen N.J. (1991). Preliminary investigations of fry mortality syndrome in rainbow trout. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 11: 77-79.
- Lorenzen E. & Karas N. (1992). Detection of *Flexibacter psychrophilum* by immunofluorescence in fish suffering from fry mortality syndrome: a rapid diagnostic method. *Dis. Aquat. Org.*, 13: 231-234.
- Madetoja J., Dalsgaard I. & Wiklund T. (2002). Occurrence of *Flavobacterium psychrophilum* in fish farming environment. *Dis. Aquat. Org.*, 52: 109-118.
- Rangdale R.E. (1995). Studies on RTFS. *PhD Thesis, University of Stirling*.
- Sarti M., Giorgetti G. & Manfrin A. (1992). Method for rapid diagnosis of visceral myxobacteriosis in reared trout in Italy. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 12: 53.
- Wakabayashi H., Toyama T. & Iida T. (1994). A study on serotyping of *Cytophaga psychrophila* isolated from fish in Japan. *Fish Pathol.*, 29: 101-104.