

**Nefrite Batterica da *Renibacterium salmoninarum* (BKD):
descrizione di un focolaio in trota lacustre
(*Salmo trutta lacustris*)**

*Outbreak of Renibacterium salmoninarum
(Bacterial Kidney Disease - BKD) in brown trout lake form
(Salmo trutta lacustris)*

**Cristian Salogni^{1*}, Mariagrazia Zanoni¹, Alessandro Mangiarotti¹,
Antonio Zanella², Giovanni Loris Alborali¹**

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, Via A. Bianchi, 9 - 25100 Brescia; ² Dipartimento di Patologia Animale, Igiene Veterinaria e Salute Pubblica, Sezione di Microbiologia e Immunologia, Università degli Studi di Milano, Via Celoria, 10 - 20100 Milano

RIASSUNTO - La Nefrite Batterica da *Renibacterium salmoninarum* è una infezione cronica dei salmonidi che determina proliferazione del rene posteriore, con presenza di lesioni granulomatoso-ascessuali di colore grigio biancastro riscontrabili anche in altri visceri. Nel presente lavoro viene descritto un focolaio di questa malattia avvenuto nella primavera del 2004 in un allevamento italiano. La patologia ha interessato una partita di trote lacustri (*Salmo trutta lacustris*) recentemente introdotta da un altro allevamento. I sintomi erano caratterizzati da: inappetenza, distensione addominale, modico esoftalmo. Le lesioni anatomopatologiche erano: anemia, proliferazione del rene posteriore con presenza di noduli grigiastri delle dimensioni variabili da pochi millimetri a mezzo centimetro, raramente visibili in altri organi (fegato e milza). *Renibacterium salmoninarum* è stato messo in evidenza con esami microscopici, colturali e mediante immunofluorescenza indiretta. Il trattamento con mangime medicato con eritromicina ha permesso il controllo della malattia e la riduzione della mortalità.

SUMMARY - *Bacterial Kidney Disease* is a chronic systemic infection of salmonids caused by *Renibacterium salmoninarum*. *BKD* produces kidney proliferation in trouts and salmon, with presence of grey-white granulomatous abscess and later in other organs. In this study we described an outbreak of this disease in an Italian farm during the spring of 2004. In the farm, brown trout lake form (*Salmo trutta lacustris*) recently introduced from another farm, was reared. The symptoms observed were: low appetite, swollen abdomen and slight exophthalmus. The lesions observed were: anemy, posterior kidney proliferation with presences of greyish abscess of about five millimetres, rarely present in other organs (liver and spleen). The presence of *Renibacterium salmoninarum* was detected with microscopical, cultural and indirect fluorescent antibody tests. Food medication with erythromycin permitted the control of disease and the reduction of mortality.

Key words: BKD, *Renibacterium salmoninarum*, Brown trout lake form, *Salmo trutta lacustris*.

* Corresponding Author: c/o Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Via A. Bianchi, 9 - 25124 Brescia. Tel.: +39 030 2290271; Fax: +39 030 2290552; E-mail: ittiopatologia@bs.izs.it

INTRODUZIONE

La malattia batterica renale o Bacterial Kidney Disease (BKD) per gli autori anglofoni, è una patologia sostenuta da *Renibacterium salmoninarum*. La BKD è stata descritta per la prima volta in Scozia, nel salmone atlantico (*Salmo salar*) e successivamente considerata cosmopolita (Evelyn *et al.*, 1986). Le informazioni specifiche riguardanti l'andamento della BKD nel nostro Paese risultano frammentarie: nel 1984 è stata descritta nella trota iridea da Ghittino *et al.*, poi solo sporadicamente segnalata.

L'agente eziologico inizialmente annoverato fra quelli con tassonomia incerta, affine al genere *Corynebacterium*, è ora considerato l'unica specie rappresentante del genere *Renibacterium*. Morfologicamente si presenta come un piccolo diplobacillo delle dimensioni di 0,3-1,5 x 0,1-1 µm, Gram positivo, immobile, asporigeno, PAS positivo e non alcool-acido resistente.

Non esistono sostanziali differenze genetiche e antigeniche fra i vari ceppi di *R. salmoninarum* isolati, sebbene sia stata dimostrata una certa variabilità di patogenicità (Starliper, 1996; Grayson *et al.*, 1999).

Renibacterium salmoninarum si comporta da patogeno intracellulare facoltativo (Gutenberger *et al.*, 1997) e si trasmette sia per via orizzontale (McKibben & Pascho, 1999) sia per via verticale (Evelyn *et al.*, 1986). La BKD colpisce i salmonidi: le specie più sensibili sono i salmoni del pacifico coho (*Oncorhynchus kisutch*) e chinook (*O. tshawytscha*), il salmone atlantico (*Salmo salar*), i salmerini (*Salvelinus alpinus*; *S. fontinalis*), la trota fario (*S. trutta*), ed infine la trota iridea (*O. mykiss*). Gli animali giovani sono caratterizzati da una maggiore sensibilità all'infezione.

La malattia ha una incidenza che è dipendente dalla temperatura. Sebbene il range termico possa variare da 8 a 18° C, il maggior rischio d'insorgenza della forma clinica è con le basse temperature (Earp *et al.*, 1953).

La malattia è caratterizzata da un andamento subacuto o cronico. I pesci affetti manifestano un quadro clinico specifico caratterizzato da anoressia, letargia e melanosì, a cui si accompagnano talvolta distensione addominale e modico esoftalmo (Lorenzen *et al.*, 1997).

Il quadro anatomopatologico è caratterizzato da anemia, rare e piccole emorragie cutanee, distensione addominale, presenza di liquido ascitico, proliferazione del rene posteriore e neoformazioni renali di aspetto simil-ascessuale, più raramente localizzate al fegato e alla milza. Nei salmoni del Pacifico vengono anche descritte lesioni muscolari granulomatose. Il sospetto di Renibatteriosi emerge dall'esame anatomopatologico. L'infezione è confermata da esami di laboratorio, quali l'immunofluorescenza, l'isolamento dell'agente e la sua identificazione tramite prove colturali, biochimiche e sierologiche.

La terapia della BKD, attuata con mangime medicato, dà buoni risultati solo se effettuata precocemente e se mantenuta per un periodo sufficientemente lungo, affinché possano venir colpite le forme batteriche nella fase di trasmissione extramacrofica (Peters & Moffit, 1996). Un antibiotico che ha dimostrato buona efficacia è l'eritromicina (dose 80 mg/kg p.v. die per 21-28 giorni). Le ricadute sono però riscontrate classicamente qualche mese post-trattamento, anche in considerazione della grande resistenza ambientale del microrganismo stesso.

Nel presente lavoro viene descritto un episodio di Malattia Batterica Renale in trota lacustre verificatosi in un allevamento nella primavera del 2004.

MATERIALI E METODI

Nel mese di Aprile del 2004, in una piscicoltura della pianura lombarda, si è verificato un episodio di mortalità in una partita di trote lacustri (*Salmo trutta lacustris*) recentemente introdotte da un'altra azienda. Nell'allevamento in questione erano presenti trote iridea allevate in vasche alimentate con acqua di fiume, mentre le trote lacustri venivano stabulate separatamente in vasche di cemento alimentate con acqua di pozzo (temperatura media di 13,5° C). Il numero complessivo delle trote lacustri, della pezzatura media di 18 grammi, era di 40.647 soggetti. La mortalità, comparsa in modo significativo la settimana successiva all'introduzione, si è protratta, con andamento variabile, oltre i due mesi (Grafico 1).

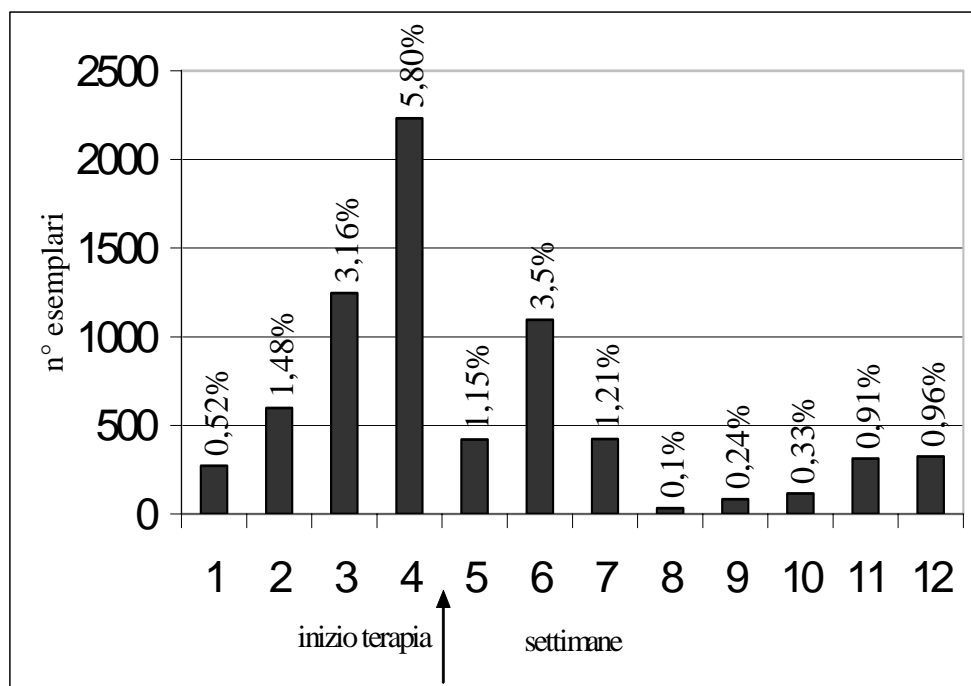


Grafico 1 - Andamento della mortalità settimanale (Aprile – Giugno).
Graphic 1 - Weekly mortality trend (April-June).

La sintomatologia era caratterizzata da: apatia, inappetenza, modico esoftalmo e distensione addominale.

Sono pervenuti complessivamente in laboratorio 150 esemplari, raggruppati in tre campionature di 50 soggetti ciascuna (con cadenza settimanale), raccolti presso le griglie tra i pesci morti o moribondi. Tutti i pesci sono stati sottoposti ad esame anatomopatologico. Gli esemplari che presentavano lesioni sospette di BKD sono stati oggetto di esame microscopico, immunofluorescenza indiretta ed esame colturale per la ricerca di

R. salmoninarum. Gli stessi soggetti, e comunque un gruppo rappresentativo dell'intero campione (20 esemplari), sono stati sottoposti ad esami routinari microscopici parassitologici a fresco da cute e branchie, colturali da visceri su Agar sangue e TSA (incubati a 22° C per 48 ore) e a esame virologico su monostrato cellulare (BF-2 e RTG-2).

Esame microscopico

Con il materiale patologico proveniente da rene o fegato è stato allestito uno striscio su vetrino, successivamente fissato al calore. Sul campione così ottenuto si è eseguita la colorazione di Gram secondo la procedura classica. L'osservazione del vetrino è stata effettuata al microscopio ottico con obiettivo ad immersione (100 x).

Esame colturale

Dagli organi con lesioni è stato eseguito l'esame colturale utilizzando un terreno agarizzato specifico per *R. salmoninarum*: il Kidney Disease Medium (KDM2), (Austin & Austin, 1987). Tale substrato è caratterizzato dalla presenza di siero fetale bovino, cisteina, triptone ed estratto di lievito. L'incubazione è durata 21 giorni a 15° C. Le colonie sospette sono state poi sottoposte a tipizzazione biochimica tramite sistema miniaturizzato API-ZYM e al test di agglutinazione rapida su vetrino, utilizzando siero policlonale di coniglio anti-*Renibacterium salmoninarum*.

Immunofluorescenza indiretta

Sono state prelevate porzioni di rene posteriore e di fegato con le lesioni caratteristiche. I campioni sono stati utilizzati direttamente per effettuare un'impronta su vetrino, fissato poi in acetone al 100% a -20° C per 15 minuti. Sono state inoltre allestite sezioni al microtomo partendo dagli stessi organi precedentemente inclusi in materiale glicolico a -25° C. La sezione di spessore di 4–6 µm è stata fissata in acetone al 100% per almeno 15 minuti a -20° C. La colorazione è stata effettuata utilizzando un siero primario policlonale e, come secondario, un siero di montone anticonglio coniugato con fluorescina isotiocianato. Ogni passaggio ha richiesto un'incubazione di 30–45 minuti in camera umida a 37° C e un lavaggio con tampone fosfato (pH 7,2). I campioni sono stati contrastati con una soluzione di Blu di Evans per 10 secondi. La lettura è stata effettuata al microscopio a fluorescenza (emissione UV, λ 540 nm).

RISULTATI

Esame anatomopatologico

I soggetti esaminati colpiti hanno mostrato uno stato di marcata anemia branchiale, modico esoftalmo e profilo ventrale a volte convesso.

L'organo interno più compromesso è stato il rene, apparso in genere parzialmente nascosto dalla vescica natatoria, a volte ispessita e biancastra. In alcuni campioni si è evidenziata la presenza di piccoli noduli di aspetto simil ascessuale, bianco-grigiastri, più frequenti nella porzione caudale dell'organo, delle dimensioni variabili da due millimetri a mezzo centimetro, talvolta confluenti e coinvolgenti la gran parte del parenchima renale (Figura 1, Figura 2). La milza ed il fegato hanno presentato raramente formazioni nodulari.



Figura 1 - Quadro anatomopatologico di BKD in trota lacustre.
Figure 1 - Bkd gross lesions in brown trout lake form.



Figura 2 - Lesioni nodulari renali.
Figure 2 - Nodular kidney lesions.

Esame microscopico

Negli organi con lesioni nodulari si è evidenziata la presenza di coccobacilli Gram positivi.

Immunofluorescenza indiretta

La positività evidenziata al microscopio ha interessato soprattutto le cellule dell'interstizio renale, assumendo colorazione gialla puntiforme a focolaio su sfondo rosso.

Esame colturale

Le colonie sospette erano caratterizzate da colorazione beige e da dimensioni massime di due millimetri, con aspetto liscio, piatto, rotondo, margini netti.

La lenta crescita delle colonie si è resa evidente dopo 14 giorni di incubazione, anche se uno sviluppo completo è stato apprezzato solo dopo 21 giorni. La semina con la tecnica a colonie separate ha permesso, dopo una adeguata incubazione, l'ottenimento di colture in purezza, tipizzate poi come *R. salmoninarum* tramite API-ZYM (Tabella 1) ed esame sierologico.

	Carattere																	
	Controllo	Phosphatasi	Butyrato	Caprylato	Myristato lipasi	Leucina	Valina	Cystina	Trypsinasi	Chemotrypsinasi	Phosphoamidasi	α -galactosidasi	β -galactosidasi	β -glucuronidasi	α -glucosidasi	β -glucosidasi	α -mannosidasi	α -fucosidasi
<i>Renibacterium salmoninarum</i>	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-

Tabella 1 - Profilo enzimatico di *Renibacterium salmoninarum* (OIE 1995, modificato).

Table 1 - Enzymatic profile of Renibacterium salmoninarum (OIE 1995, modified).

L'esame di agglutinazione rapida su vetrino ha evidenziato la formazione di una flocculazione fine ed uniforme ben evidente in controllo; una controprova con soluzione fisiologica ha permesso di differenziare ceppi autoagglutinanti.

Gli esami parassitologici, batteriologici e virologici, effettuati in parallelo, hanno avuto esito negativo.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Le indagini condotte mediante esame anatomopatologico, esame microscopico e tecnica di I.F. su sezioni ed impronta d'organo hanno rilevato in tutti i campioni la presenza di *R. salmoninarum*. E' stata evidenziata una buona correlazione fra i risultati ottenuti tramite esame anatomopatologico, immunofluorescenza indiretta ed esame colturale sui campioni (Tabella 2).

Conferimento (N° esemplari)	ESAME ANATOMOPATOLOGICO			Immuno- fluorescenza	Esame colturale
	% lesioni aspecifiche	% lesioni nodulari renali	% lesioni nodulari extrarenali		
1 (50)	50	10	0	P	P
2 (50)	50	1	1	P	N
3 (50)	50	20	1	P	P

Note alla tabella 2/ *Table 2 notes.*

Esame anatomopatologico: le lesioni aspecifiche considerate sono state: anemia, distensione addominale, modico esoftalmo./ *Necroscopy examination: aspecific lesions observed: anemy, swollen abdomen and exophthalmus.*

Immunofluorescenza/Immunofluorency : N= Assenza di fluorescenza/*No fluorency observed*
P= Aree di fluorescenza renale/*Presence of fluorency.*

Esame colturale/ *Cultural examination:* N= Mancata crescita di colonie di *R. salmoninarum*/*No growth of R. salmoninarum*
P= Crescita di colonie di *R. salmoninarum*/*Growth of R salmoninarum*

Tabella 2 - Confronto fra i sistemi diagnostici.
Table 2 - Comparison between different diagnostic tests.

L'esame colturale ha confermato, inoltre, i dati ottenuti con le tecniche diagnostiche rapide in tutti i casi, con la sola eccezione del campione numero 2, dove l'esiguo numero di esemplari che presentavano lesioni non ha permesso l'isolamento.

In merito all'esame anatomopatologico si deve considerare che solo una piccola percentuale di soggetti, variabile dal 2 al 20%, presentavano lesioni sospette di BKD, contro un elevato numero di esemplari con lesioni a carattere più aspecifico (50%).

I risultati ottenuti hanno confermato l'infezione di *R. salmoninarum* in trota lacustre. Tale dato consente di rilevare l'importanza di una campionatura corretta da effettuarsi in allevamento e di un attento esame anatomopatologico atto ad individuare gli esemplari più significativi da sottoporre a successive analisi di laboratorio, al fine di confermare l'infezione da *Renibacterium salmoninarum*.

La diagnosi di BKD su specie ittiche destinate a ripopolamento è da ritenersi di notevole importanza in quanto la malattia costituisce un serio pericolo per le popolazioni di salmonidi autoctone viventi nelle acque pubbliche che, a seguito dell'immissione di soggetti infetti, potrebbero contrarre l'infezione trasmettendola successivamente per via verticale alla progenie. Tali popolazioni selvatiche infette potrebbero costituire un importante serbatoio della malattia.

L'intervento terapeutico mirato e precoce, effettuato con mangime medicato con eritromicina tiocianato, alla dose di 80 mg/kg p.v. die per 28 giorni (razione 1% p.v. giornaliera), ha permesso il controllo della malattia e la riduzione della mortalità.

BIBLIOGRAFIA

- Austin B. & Austin D.A. (1987). Bacterial Fish Pathogens: Disease in farmed and Wild Fish. *Hellis, Horwood Limited*.
- Earp B.J., Ellis C.H. & Ordal E.J. (1953). Kidney disease in young salmon. *Washington Department of Fisheries, Special Report*, 1: 1-74.
- Evelyn T.P.T., Prosperi-Porta L. & Ketcheson J.E. (1986). Experimental intra ovum infection of salmonid eggs with *Renibacterium salmoninarum* and vertically transmission of the pathogen with such eggs despite their treatment with erythromycin. *Dis. Aquat. Org.*, 1: 197-202.
- Ghittino P., Andruetto S. & Gobetto M. (1984). Rassegna sulla Nefrite Batterica dei Salmonidi osservata in Italia. *Riv. It. Piscic. Itiop.*, A., 19, 4: 156-166.
- Gutenberger S.K., Duimstra J.R., Rohovec J.S. & Fryer J.L. (1997). Intracellular survival of *Renibacterium salmoninarum* in trout mononuclear phagocytes. *Dis. Aquat. Org.*, 28: 93-106.
- Grayson T.H., Cooper L.F., Antienzar F.A., Knowles M.R. & Gilpin M. L. (1999). Molecular differentiation of *Renibacterium salmoninarum* isolates from Worldwide locations. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 3: 961-968.
- Lorenzen E., Olesen N.J., Korsholm H., Heuer O.E. & Evensen O. (1997). First demonstration of *Renibacterium salmoninarum* / BKD in Denmark. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 17, 3-4: 140-144.
- McKibben C.L. & Pascho R.J. (1999). Shedding of *Renibacterium salmoninarum* by infected chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha*. *Dis. Aquat. Org.*, 38: 75-79.
- OIE (1995) Diagnostic Manual for Aquatic Animal Diseases. *International Aquatic Animal Health Code*: 113-125.
- Peters K.K. & Moffit C.M. (1996). Optimal dosage of erythromycin thiocyanate in a new feed additive to control Bacterial Kidney Disease. *J. Aquat. Animal Health*, 8: 229-240.
- Starliper C.E. (1996) Genetic diversity of North American isolates of *Renibacterium salmoninarum*. *Dis. Aquat. Org.*, 27: 207-213.