

Infezione sperimentale da *Citrobacter freundii* in pesci rossi (*Carassius auratus*) d'acquario

Citrobacter freundii experimental infection in aquarium goldfish (*Carassius auratus*)

Marino Prearo^{1*}, Rinaldo Brunetti¹, Paola Arsieni¹,
Elena Pavoletti¹, Loredana Locatelli¹, Giuseppe Amato²

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

² C.I.A. Centro Internazionale Acquari, Strada del Francese, 97/2C - 10100 Torino

RIASSUNTO - *Citrobacter freundii* è un germe Gram negativo appartenente alle *Enterobacteriaceae* e sempre più frequentemente viene segnalato come possibile patogeno in diverse specie ittiche. Scopo di questo lavoro è quello di poter osservare il quadro anatomopatologico causato dall'inoculazione di ceppi di campo e di referenza di *C. freundii* in pesci rossi (*Carassius auratus*). Sono stati inoculati 20 soggetti, suddivisi in 4 lotti da 5 individui ciascuno, con due ceppi di *C. freundii* di cui uno della collezione DSMZ e un ceppo di campo. Sono stati inoculati 0,2 ml/pesce di soluzione batterica contenente 10^8 e 10^6 UFC/ml; inoltre 5 pesci inoculati con soluzione fisiologica sterile sono stati inclusi nel lotto di controllo negativo. I pesci sono stati controllati per dieci giorni; i soggetti deceduti sono stati sottoposti ad esame anatomopatologico e colturale; i sopravvissuti sono stati sacrificati e sottoposti agli stessi esami. Il *C. freundii* è stato isolato da tutti i soggetti morti e da alcuni pesci sofferenti; sono giunti a morte 9 pesci su 20 inoculati (45%); la comparsa dei primi sintomi, rappresentati da emorragie cutanee, è avvenuta dopo circa 48 ore p.i.; l'esame anatomopatologico ha mostrato emorragie interne, presenza di liquido ascitico nella cavità peritoneale e gastro-enterite. Tra tutti i pesci successivamente soppressi, 3 esemplari presentavano scarse emorragie cutanee e soltanto in alcuni soggetti presenza di emorragie viscerali ed enterite. Il lotto in cui si è avuta la percentuale maggiore di mortalità è stato quello inoculato con il ceppo di referenza alla concentrazione maggiore (4 soggetti su 5); in entrambi i lotti inoculati con il ceppo di campo si è avuta invece una mortalità di 2 soggetti. Con questo lavoro si è dimostrata sperimentalmente l'infezione da *C. freundii* in *C. auratus* con fenomeni sintomatologici e rilievi anatomopatologici apprezzabili. *C. freundii* può essere quindi annoverato tra i possibili patogeni per i pesci, soprattutto se stabulati in condizioni precarie e che hanno subito forti stress.

SUMMARY – *Citrobacter freundii* is a Gram negative rod pertaining to the family of *Enterobacteriaceae* and it comes more and more frequently marked as a possible pathogen in different kind of fish. The aim of this study was to observe the pathologic features from wild stocks and Reference strains experimentally inoculated in goldfish (*Carassius auratus*). 20 fish in four groups, of 5 subjects each, were inoculated. A *Citrobacter freundii* strain from DSMZ collection and a wild strain were used, with 10^6 - 10^8 CFU/mL in 0.2 mL/ fish bacterial solution. As a negative control, sterile saline solution was inoculated in 5 fish. All subjects were observed for 10 days; 9 of 20 fish died (45%). Necropsy and bacteriological exams were performed on dead fish. Survivors were sacrificed and treated as those which had naturally died. *C. freundii* isolation was successful in all naturally dead fish and in some suffering subjects. Cutaneous haemorrhages appeared 48 hours after inoculation, as a first sign of the disease. Necropsic examinations showed diffused haemorrhages, ascites of peritoneal abdomen and gastroenteritis. Of all the sacrificed fish, just 3 showed light cutaneous haemorrhages. The highest incidence of death was seen in those fish inoculated with the reference strain at the highest concentration (4 out of 5 deaths). In groups inoculated with wild strain each contained 2 dead fish. This study has experimentally demonstrated *C. freundii* infection in *C. auratus*, with evident pathologic symptoms. Therefore, *C. freundii* can be considered a possible pathogen for fish, especially if stored in poor conditions and under extreme stress.

Key words: Enterobacteriaceae, *Citrobacter freundii*, Goldfish, *Carassius auratus*, Experimental infection.

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

INTRODUZIONE

Citrobacter freundii è un germe bastoncellare, Gram negativo, appartenente alla famiglia delle *Enterobacteriaceae*, comunemente isolato da suolo, acqua, alimenti di varia natura, da organi di animali sani o malati, inclusi mammiferi, uccelli, rettili, anfibi e pesci; viene pertanto considerato un germe opportunista o patogeno secondario (Sakazaki, 1984; Toranzo *et al.*, 1994).

Usualmente è un germe mobile per flagelli peritrichi a 25° C, non capsulato, anaerobio facoltativo; presenta un metabolismo sia di tipo ossidativo sia fermentativo ed una crescita sulla maggior parte dei terreni ordinari. Le colonie su agar nutritivo si presentano generalmente lisce, traslucide od opache, aventi un diametro di circa 2-4 mm; risulta essere negativo al test dell'ossidasi e positivo a quello della catalasi. Presenta delle caratteristiche biochimiche che permettono la sua differenziazione da altre specie del genere: produce idrogeno solforato, ma non indolo; è negativo al test di Voges-Proskauer (produzione di acetoina dal piruvato di sodio); è in grado di utilizzare il citrato trisodico, ma non possiede l'enzima ureasi; possiede l'enzima β -galattosidasi, ma non la lisina decarbossilasi; è negativo per l'idrolisi della gelatina. Fermenta il glucosio, il mannitolo, il sorbitolo, il ramnosio, l'arabinosio, ma non l'inositolo, il lattosio ed il raffiniosio (Sakazaki, 1984).

C. freundii è normalmente resistente ai farmaci β -lattamici per la produzione di una β -lattamasi cromosomica di classe C, AmpC indotta (Sanders *et al.*, 1997; Barlow & Hall, 2002) e può essere resistente alle cefalosporine di terza generazione (Jones, 1998).

Nell'uomo spesso causa infezioni in pazienti con prolungata degenza e immunocompromessi (Chen *et al.*, 2002). È causa di forme enteriche (Kim *et al.*, 2003), infezioni all'apparato urinario (Gill & Schutze, 1999), respiratorio (Matsui, 1994), al fegato (Yamada *et al.*, 2000) e alle vie biliari (Chen *et al.*, 2002), pancreatiti (de Madaria *et al.*, 2005), endocarditi (Gonzalez *et al.*, 1999), osteomieliti (Stricker *et al.*, 1998) e infezioni in pazienti variamente debilitati (Nada *et al.*, 2004). Inoltre può essere causa di meningiti (Tang *et al.*, 1993; Chuang *et al.*, 1999; Lu *et al.*, 1999) con alta mortalità soprattutto nelle forme neonatali (Badger *et al.*, 1999). Sono state inoltre segnalate infezioni neonatali da *C. freundii* acquisite per via verticale dalle madri (Gupta *et al.*, 2001).

L'infezione nosocomiale da *C. freundii* provoca un maggior rischio in termini di un prolungamento dell'ospedalizzazione dei pazienti, con un numero superiore alla norma di intubazioni, tracheotomie e cateterismi (Chen *et al.*, 2002). Il ruolo che tale germe riveste comunque nella patologia umana, proprio per la sua bassa virulenza, appare particolare in quanto determina sulla popolazione ospite lunghi periodi di persistenza; questo anche per le resistenze plasmidiche ai farmaci accumulate nel tempo (Pepperell *et al.*, 2002).

Negli ultimi anni il numero delle descrizioni di casi d'infezioni da *C. freundii* in specie ittiche è notevolmente aumentato (Sato *et al.*, 1982; Fuhrmann *et al.*, 1984; Austin & McIntosh, 1991; Sanz 1991; Austin *et al.*, 1992; Karunasagar *et al.*, 1992; Aydin *et al.*, 1997; Austin & Cross, 1998; Jeremic *et al.*, 2002). Negli Stati Uniti e in Spagna il *C. freundii* è stato segnalato sempre più spesso come patogeno in varie specie di pesci e l'isolamento del germe viene sovente associato ad alti livelli di inquinamento. Tuttavia, nel 1991, è stato descritto un episodio con alta mortalità in trotelline iridea (*Oncorhynchus mykiss*) di 2-5 g di peso, avvenuto in un allevamento spagnolo che utilizzava acqua di sorgente a temperatura di 14° C e con apparenti bassi livelli di inquinamento; le trote sono risultate infette anche al virus della Necrosi Pancreatica Infettiva (Sanz, 1991).

C. freundii è stato segnalato anche come causa di gastroenteriti con basso tasso di mortalità in trote d'allevamento di circa 100 grammi. Esternamente non venivano segnalate lesioni e gli organi interni quali cuore, fegato, rene e milza apparivano normali, mentre il tratto digerente si mostrava rigonfio per la presenza di muco acquoso (Austin *et al.*, 1992).

È stato segnalato in India un caso ad elevata mortalità in una partita di carpette comuni (*Cyprinus carpio*) provenienti da un allevamento locale. Le carpe, di una lunghezza compresa tra gli 8 e 12 cm, presentavano emorragie a livello della cute, degli occhi e alla base delle pinne; l'esame anatomopatologico ha evidenziato emorragie peritoneali e iperplasia del rene (Karunasagar *et al.*, 1992). È stata testata la virulenza del germe isolato per determinare la DL₅₀ estendendo la prova oltre che sulle carpe anche su topo: i risultati ottenuti hanno stabilito che la DL₅₀ è compresa tra 10⁵ e 10⁶ UFC/ml sia per il topo che per la carpa comune.

Inoltre è stato descritto un caso di infezione da *C. freundii* in un pesce luna (*Mola mola*) stabulato in acquario, dove ha provocato lesioni renali molto simili a quelle tumorali (Sato *et al.*, 1982).

Anche le descrizioni di infezioni da *C. freundii* in pesci d'acquario risultano sempre più frequenti. È stato isolato dal tratto intestinale e da altri tessuti di scalari (*Pterophyllum* sp.) in un allevamento di pesci tropicali: i soggetti colpiti mostravano inappetenza, feci pallide e filamentose, intestino con lieve enterite necrotica; nei soggetti più giovani si è evidenziata un'elevata mortalità, mentre i soggetti adulti hanno presentato un ridotto tasso di ovodeposizione (Fitzgerald, 1998). Altre descrizioni sono state effettuate da Apun *et al.* (1999), in pesci ornamentali allevati in bacini.

Nel 2002, Guz ha segnalato *C. freundii* come patogeno nel ciclode *Tropheus brichardi*, dove è stato isolato dal rene, dal fegato, dal sangue e dal tubo digerente, mentre Taylor (2003) ha descritto un episodio su carpe koi (*C. carpio* var. *koi*).

In un recente studio effettuato su un numero considerevole di esemplari appartenenti al gruppo dei killi (Cyprinodontidi) e provenienti da acquari privati ed allevamenti amatoriali, *C. freundii* è stato isolato frequentemente (Prearo *et al.*, 2005).

Alla luce di quanto esposto, scopo del presente lavoro è di poter valutare l'azione patogena di *C. freundii* in pesci rossi (*Carassius auratus*) stabulati in acquario, mediante infezione sperimentale, descrivendone la sintomatologia e il quadro anatomopatologico.

MATERIALI E METODI

Per la sperimentazione sono stati utilizzati due ceppi di *C. freundii*: il primo è rappresentato dal ceppo di riferimento 30039 della DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen); il secondo da un ceppo appartenente alla collezione del laboratorio di Ittiopatologia di Torino, isolato nel 2004 da *Carassius auratus* (ITP 103951/04).

I ceppi, stoccati in provette cryobank (Mast Diagnostic) a -80° C, sono stati fatti crescere su Agar sangue (AGS) per 24 ore a 22° C; successivamente sono stati nuovamente testati fenotipicamente su terreni selettivi (McConkey agar) e biochimicamente mediante gallerie API 20E (bioMérieux). Inoltre è stata saggiata per entrambi i ceppi la sensibilità ai chemioterapici, approntando un antibiogramma secondo la tecnica di Kirby-Bauer.

Una volta appurata la purezza e la congruità delle colonie sviluppatesi, queste sono state diluite in soluzione fisiologica alla concentrazione 3 della scala di McFarland, corrispondente a circa 10⁸ UFC/ml. Da queste concentrazioni madre, sono state preparate due soluzioni diluite, corrispondenti a circa 10⁶ UFC/ml.

Le 4 soluzioni così approntate sono state inoculate intraperitonealmente, alla dose di 0,2 ml/capo, in pesci rossi della lunghezza di circa 8 cm che avevano subito preventivamente una stabulazione di 10 giorni negli acquari di sperimentazione per l'adattamento alle condizioni di prova (vasche aventi dimensioni di 30 x 40 cm). I soggetti sono stati anestetizzati, mediante l'utilizzo di Tricaina Metansulfonato (MS 222 - Sigma), al dosaggio

di circa 100 mg/litro. Per ogni diluizione sono stati inoculati 5 pesci; inoltre si è approntata una quinta prova, come controllo negativo, costituita da 5 soggetti inoculati con soluzione fisiologica sterile; ogni lotto di pesci è stato contraddistinto mediante numeri progressivi (Tabella 1).

Numero	N° soggetti	Tipologia inoculo	Dosaggio/capo
1	5	Ceppo di riferimento 30039 DSMZ	0,2 ml di soluzione 10 ⁸ UFC/ml
2	5	Ceppo di riferimento 30039 DSMZ	0,2 ml di soluzione 10 ⁶ UFC/ml
3	5	Ceppo di campo ITP 103951/04	0,2 ml di soluzione 10 ⁸ UFC/ml
4	5	Ceppo di campo ITP 103951/04	0,2 ml di soluzione 10 ⁶ UFC/ml
5	5	Soluzione fisiologica	0,2 ml

Tabella 1 – Elenco dei lotti di sperimentazione con relativa numerazione e soluzione utilizzata.
Table 1 – List of the experimental trials with relative enumeration and solution used.

Si è proceduto all'osservazione giornaliera dei soggetti sotto sperimentazione, per poter osservare l'eventuale sintomatologia e la comparsa di lesioni cutanee. Il controllo è proseguito per 10 giorni dall'inoculazione. Tutti i soggetti deceduti nel corso della prova sono stati sottoposti ad esame anatomopatologico e colturale. Al termine dei giorni di osservazione, i soggetti sopravvissuti sono stati soppressi mediante anestesia profonda e spinalizzazione: si è quindi proceduto ad effettuare anche su di essi un esame anatomopatologico e l'esame colturale.

RISULTATI

I due ceppi sono apparsi biochimicamente differenti in quanto hanno presentato delle difformità in alcune reazioni presenti nelle gallerie API 20E (bioMérieux). Il ceppo di riferimento 30039 DSMZ ha presentato il profilo biochimico 1604533, mostrando positività ai test enzimatici ONPG (β -galattosidasi), CIT (utilizzo del citrato), H₂S ed ai test fermentativi GLU, MAN, SOR, RHA, SAC, AMY e ARA; il ceppo di campo ITP 103951/04 invece ha manifestato il profilo biochimico 0604572, risultando positivo ai test enzimatici CIT, H₂S e ai test fermentativi GLU, MAN, SOR, RHA, SAC, MEL, AMY, ARA.

L'antibiogramma, eseguito su terreno Mueller-Hinton seguendo la metodica di Kirby-Bauer, ha evidenziato resistenza per Tiamfenicolo, Amoxicillina ed Ampicillina e sensibilità verso Acido oxolinico, Enrofloxacin, Flumequine, Ossitettraciclina, Sulfamidico potenziato con Trimethoprim e Tetraciclina nel caso del ceppo di riferimento DSMZ, mentre per il ceppo di campo, anche il Tiamfenicolo è risultato sensibile.

Dopo 48 ore dall'inoculazione tre soggetti appartenenti al lotto sperimentale 1, due del lotto sperimentale 3 e 2 del lotto sperimentale 4 sono deceduti. Dopo 5 giorni dall'inoculo è

morto un quarto soggetto appartenente al lotto sperimentale 1 e un pesce del lotto 2 (Tabella 2).

Numero lotto sperimentale	N° soggetti inoculati	N° soggetti deceduti dopo 48 ore post inoculazione	N° soggetti deceduti dopo 120 ore post inoculazione	N° soggetti sopravvissuti dopo 10 giorni post inoculazione
1	5	3	1	1
2	5	-	1	4
3	5	2	-	3
4	5	2	-	3
5	5	-	-	5
Totale	25	7	2	16

Tabella 2 – Numero di soggetti deceduti dopo l'inoculazione di *Citrobacter freundii*.
Table 2 – Number of fish died after inoculation of *Citrobacter freundii*.

L'esame anatomopatologico ha evidenziato la presenza di liquido ascitico e di una forma di enterite nei soggetti del lotto 3, la presenza di emorragie sparse ai visceri ed enterite nei pesci rossi del lotto 4. Gli individui appartenenti ai lotti 1 e 2 invece hanno mostrato abbondante liquido ascitico in cavità addominale ed emorragie viscerali diffuse.

L'isolamento batteriologico effettuato su piastre di AGS incubate a $22 \pm 2^\circ$ C per 24 ore, ha permesso in tutti i casi di mettere in evidenza in purezza colonie batteriche Gram negative, ossidasi negative e catalasi positive, che all'analisi biochimica sono state classificate come *C. freundii*.

I soggetti sacrificati al 10° giorno di sperimentazione non hanno presentato lesioni evidenti, tranne che per scarse emorragie cutanee in 2 esemplari appartenenti al lotto 2 ed un pesce del lotto 3. Anche in questo caso, dai 16 soggetti rimasti vivi e soppressi, l'esame batteriologico ha portato all'isolamento di *C. freundii* in altri 6 casi (Tabella 3). Nei restanti 5 soggetti dei lotti inoculati e nei 5 pesci rossi del controllo negativo non è stato possibile isolare il germe.

Numero lotto sperimentale	N° soggetti inoculati	N° soggetti deceduti	N° soggetti sacrificati e positivi per <i>C. freundii</i>	N° soggetti sacrificati e negativi per <i>C. freundii</i>
1	5	4	1	-
2	5	1	2	2
3	5	2	2	1
4	5	2	1	2
5	5	-	-	5
Totale	25	9	6	10

Tabella 3 – Numero di soggetti sopravvissuti ritrovati positivi o negativi a *Citrobacter freundii*.
Table 3 – Number of fish surviving positive or negative finding to *Citrobacter freundii*.

Tutti i ceppi batterici isolati hanno presentato un profilo biochimico sovrapponibile a quello dei ceppi utilizzati per l'inoculo.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Nelle diverse indagini batteriologiche condotte dal Laboratorio di Ittiopatologia dell'Istituto Zooprofilattico del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta di Torino, nel corso degli ultimi tre anni, *Citrobacter freundii* è stato isolato più volte da pesci d'acquario giunti per determinarne la causa della morte, come *Aequidens pulcher*, *Aphyosemion elberti*, *Balantiocheilos melanopterus*, *Betta macrostoma*, *Betta splendens*, *Carassius auratus*, *Carnegiella strigata*, *Crenicara punctulata*, *Gnathonemus petersii*, *Gyrinocheilos aymonieri*, *Hemichromis lifalili*, *Macropodus opercularis*, *Moenkhausia pittieri*, *Nothobranchius eggersi*, *N. rachovii*, *Otocinclus affinis*, *Paracheirodon axelrodi*, *Pituna compacta*, *Poecilia reticulata*, *Pterophyllum scalare*, *Simpsonichthys fulminantis*, *S. perpendicularis*, *Trichogaster trichopterus*, *Xenentodon cancila* e *Xiphophorus helleri*. Nella maggior parte dei casi l'isolamento batterico non era preceduto da una chiara sintomatologia e da un quadro anatomopatologico evidente. Solo in rari casi, registrati direttamente nei pesci stabulati in vasche presenti nel laboratorio di Torino o segnalati da alcuni proprietari di acquari privati, i pesci giunti alle analisi avevano presentato una sintomatologia gastroenterica e presenza di petecchie emorragiche cutanee. Nella maggior parte dei casi invece, non è stata segnalata sintomatologia e alla necropsia non si sono messi in evidenza particolari lesioni agli organi interni. Quindi, in base alla bibliografia scientifica pubblicata, con descrizioni di pochi episodi morbosi causati da *C. freundii* in diverse specie ittiche (Sato *et al.*, 1982; Sanz, 1991; Austin *et al.*, 1992; Karunasagar *et al.*, 1992; Toranzo *et al.*, 1994; Aydin *et al.*, 1997; Fitzgerald, 1998; Guz, 2002; Taylor, 2003), ai rari isolamenti di laboratorio in pesci d'acquario con sintomatologia manifesta e alla relativa frequenza degli isolamenti in pesci deceduti senza un quadro manifesto di patologia (Prearo *et al.*, 2005), si è cercato di valutare la possibile patogenicità del germe nei confronti di una specie particolarmente adattabile a diverse situazioni ambientali come il pesce rosso.

Nella sperimentazione sono stati utilizzati due ceppi diversi di *C. freundii*, uno di referenza e uno di campo, aventi un profilo biochimico diverso, in modo da poter valutare eventuali differenze sintomatologiche e patologiche. In entrambi i casi le manifestazioni sintomatologiche, il quadro anatomopatologico e la mortalità sono risultate sovrapponibili, sia nei lotti in cui si è utilizzata una concentrazione maggiore, sia in quelli dove è stata inoculata una soluzione 100 volte più diluita. La scelta della via di somministrazione del germe attraverso inoculazione intraperitoneale ha permesso di mettere in evidenza il quadro causato dal batterio in questione, senza la compartecipazione di eventi esterni ambientali favorenti; con questa prova pertanto si è potuto dimostrare sperimentalmente l'infezione da *C. freundii* in *Carassius auratus* con fenomeni sintomatologici e rilievi anatomopatologici del tutto sovrapponibili a quanto descritto in letteratura.

Resta da ribadire come l'ambiente acquario, con il sistema di ricircolo dell'acqua e amplificazione attraverso il sistema filtrante dei germi eventualmente presenti, la condizione di stress da sovraffollamento e l'alta concentrazione di sostanza organica e di cataboliti che possono causare lesioni branchiali predisponenti l'insorgenza di patologie batteriche ad irruzione secondaria, favoriscono senz'altro la comparsa di infezioni che possono sfociare precocemente nel decesso dei soggetti senza causare sintomi e lesioni riconducibili ad un quadro primario di infezione batterica. Molto probabilmente questa spiegazione può essere ricondotta alla casistica riportata, dove gli isolamenti di *C. freundii*, come anche di altre specie batteriche quali, *Aeromonas hydrophila*, *A. sobria*, *Plesiomonas shigelloides*,

Pseudomonas fluorescens, ecc., risulta essere frequente (Locatelli *et al.*, 2003; Prearo *et al.*, 2005).

L'importanza delle infezioni causate da *C. freundii* in specie ittiche d'allevamento utilizzate per il consumo umano e in misura minore nelle specie ornamentali, è data dal fatto che, come succede in medicina umana, tale batterio può presentare facilmente delle resistenze agli antibiotici comunemente utilizzabili (Matsuo, 1994; Sanders *et al.*, 1997; Jones, 1998; Barlow & Hall, 2002; Chen *et al.*, 2002; Pepperell *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2003; Nada *et al.*, 2004): pertanto, come accade nelle infezioni nosocomiali, anche nel trattamento di tali affezioni è possibile avere numerosi insuccessi terapeutici.

Quindi, *C. freundii* deve essere rivalutato come possibile patogeno per i pesci ornamentali, soprattutto se stabulati in condizioni precarie e se hanno subito forti stress sia di origine fisica che biologica.

A conclusione di questo studio bisogna comunque ricordare che resta da valutare la reale patogenicità di *C. freundii* in pesci presenti nelle acque libere, dove le condizioni stressanti predisponenti presentano una minore rilevanza rispetto all'ambiente tipicamente circoscritto dell'acquario.

BIBLIOGRAFIA

Apun K., Yusof A.M. & Jugang K. (1999). Distribution of bacteria in tropical freshwater fish and ponds. *Int. J. Environ. Health Res.*, 9, 4: 285-292.

Austin B. & Cross N. (1998). Infection of pronephros cell cultures derived from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) with bacterial fish pathogens: a comparison with whole fish infectivity studies. *Methods in Cell Science*, 19, 4: 317-324.

Austin B. & McIntosh D. (1991). New bacterial fish pathogens and their implications for fish farming. *Rev. Medical Microbiol.*, 2, 4: 230-236.

Austin, B., Stobie M. & Robertson P.A.W. (1992). *Citrobacter freundii*: the cause of gastro-enteric leading to progressive low level mortalities in farmed rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* Walbaum, in Scotland. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, 12: 166-167.

Aydin S., Çelebi S. & Akyurt Y. (1997). Clinical and pathological investigation of *Citrobacter freundii* infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Turkish J. Vet. Animal Sci.*, 21, 6: 497-502.

Badger J.L., Stins M.F. & Kim K.S. (1999). *Citrobacter freundii* invades and replicates in human brain microvascular endothelial cells. *Infect. Immun.*, 67, 8: 4208-4215.

Barlow M. & Hall B.G. (2002). Origin and evolution of the AmpC β -lactamases of *Citrobacter freundii*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 46, 5: 1190-1198.

Chen Y.-S., Wong W.-W., Fung C.-P., Yu K.-W. & Liu C.-Y. (2002). Clinical features and antimicrobial susceptibility trends in *Citrobacter freundii* bacteremia. *J. Microbiol. Immunol. Infect.*, 35: 109-114.

Chuang Y.-C., Chang W.-N. & Lu C.-H. (1999). Adult *Citrobacter freundii* meningitis: case report. *Changeng Yi Xue Za Zhi.*, 22, 4: 649-653.

de Madaria E., Martinez J., Lozano B., Sempere L., Benlloch S., Such J., Uceda F., Frances R. & Perez-Mateo M. (2005). Detection and identification of bacterial DNA in serum from patients with acute pancreatitis. *Gut*, 54, 9: 1293-1297.

- Fitzgerald S.D. (1998). Citrobacteriosis associated with mortality in aquaria-reared angelfish. *Twenty-Third Annual Eastern Fish Health Workshop; 30 March-2 April, 1998, Plymouth, MA 02360, USA.*
- Fuhrmann H., Bohm K.H. & Schlotfeldt H.-J. (1984). On the importance of enteric bacteria in the bacteriology of freshwater fish. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 4, 3: 42-46.
- Gill M. & Schutze G.E. (1999). *Citrobacter* urinary tract infections in children. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 18, 10: 889-892.
- Gonzalez C.C., Aguirre R.J., Garrofa V.E. & Bragado G.F. (1999). *Citrobacter freundii* endocarditis. *An. Med. Interna*, 16, 7: 363-364.
- Gupta P., Gupta D., Singh N.P. & Faridi M.M.A. (2001). Vertical transmission of *Citrobacter freundii*. *Indian Pediatrics*, 38: 110-111.
- Guz L. (2002). *Citrobacter freundii* isolated from diseased *Tropheus brichardi*. *Annales UMCS (Lubin) section DD*, 58: 89-92.
- Jeremic S., Jakic-Dimic D. & Veljovic L.J. (2003). *Citrobacter freundii* as a cause of disease in fish. *Acta Vet., Beograd*, 53, 5-6: 399-410.
- Jones R.N. (1998). Important and emerging β -lactamase-mediated resistances in hospital-based pathogens: the AmpC enzymes. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 31: 461-466.
- Karunasagar, I., Karunasagar I., & Rai R. (1992). Systemic *Citrobacter freundii* infection in common carp, *Cyprinus carpio* L., fingerlings. *J. Fish Dis.*, 15: 95-98.
- Kim P.W., Harris A.D., Roghmann M.-C., Morris Jr. J.G., Strinivasan A. & Perencevich E.N. (2003). Epidemiological risk factors for isolation of ceftriaxone-resistant versus -susceptible *Citrobacter freundii* in hospitalized patients. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 47, 9: 2882-2887.
- Locatelli L., Pavoletti E., Moroni P., Cabra S., Gilli P., Prearo D. & Prearo M. (2003). Principali patologie batteriche riscontrate in pesci d'acquario nazionali e d'importazione. *Boll. Soc. It. Patol. Ittica*, 36: 42-52.
- Lu C.-H., Chang W.-N., Chuang Y.-C. & Chang H.-W. (1999). Gram negative bacillary meningitis in adult post-neurosurgical patients. *Surg. Neurol.*, 52: 438-444.
- Matsui S. (1994). A case of severe pneumonia in an elderly man, caused by *Citrobacter freundii* suspected to have a low susceptibility to imipenem/cilastatin sodium. *Jpn. J. Thoracic Dis.*, 32, 11: 1078-1082.
- Nada T., Baba H., Kawamura K., Ohkura T., Torii K. & Ohta M. (2004). A small outbreak of third generation cephem-resistant *Citrobacter freundii* infection on a surgical ward. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 57: 181-182.
- Pepperell C., Kus J.V., Gardam M.A., Humar A. & Burrows L.L. (2002). Low-virulence *Citrobacter* species encode resistance to multiple antimicrobials. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 46, 11: 3555-3560.
- Prearo M., Amato G., Locatelli L., Arsieni P., Solenne A., Prearo D., Abete M.C. & Pavoletti E. (2005). Principali patologie di origine batterica osservate in killi allevati in acquario: nota preliminare. *Ittiopatologia*, 2, 1: 21-34.

- Sanders C.C., Bradford P.A., Ehrhardt A.F., Bush K., Young K.D., Henderson T.A. & Sanders Jr. W.E. (1997). Penicillin-binding proteins and induction of AmpC β -lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 41: 2013-2015.
- Sakazaki R. (1984). Genus IV. *Citrobacter* Werkman and Gillen, 1932. In *Bergey's Manual of systematic bacteriology*, vol. 1, Williams & Wilkins, Baltimore: 458-461.
- Sanz F. (1991). Rainbow trout mortalities associated with a mixed infection with *Citrobacter freundii* and IPN virus. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, 11: 222.
- Sato N., Yamane N. & Kawamura T. (1982). System *Citrobacter freundii* infection among sunfish *Mola mola* in Matsushima aquarium. *Bull. Jap. Soc. Scientific Fisher.*, 48: 1551-1557.
- Stricker T., Frohlich S. & Nadal D. (1998). Osteomyelitis and septic arthritis due to *Citrobacter freundii* and *Haemophilus influenzae* type b. *J. Paediatrics Child Health*, 34, 1: 90-91.
- Tang L.-M., Chen S.-T. & Lui T.-N. (1993). *Citrobacter* meningitis in adults. *Clin. Neurol. Neurosurgery*, 96: 52-57.
- Taylor P.W. (2003). Multiple antimicrobial resistance in a chronic bacterial infection of koi carp. *North Am. J. Aquaculture*, 65, 2: 120-125.
- Toranzo A.E., Cutrín J.M., Robertson B.S., Núñez S., Abell J.M., Hetrick F.M. & Baya A.M. (1994). Comparison of the taxonomy, serology, drug resistance transfer and virulence of *Citrobacter freundii* strains from mammals and poikilothermic hosts. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 6: 1789-1797.
- Yamada T., Murakami K., Tsuchida K., Ohara H., Nakazawa T., Sano H., Ando H., Hashimoto T., Nomura T., Yokoyama Y. & Itoh M. (2000). Ascending cholangitis as a cause of pyogenic liver abscesses complicated by a gastric submucosal abscess and fistula. *J. Clin. Gastroenterol.*, 30, 3: 317-320.