

**INDAGINE ISTOLOGICA E  
IMMUNOISTOCHEMICA IN BRANZINI  
(*Dicentrarchus labrax*) INFETTATI  
SPERIMENTALMENTE CON  
*Pasteurella piscicida***

GALEOTTI M., VOLPATTI D., DEL GRANO N., VOLPELLI L.A.  
*Dipartimento di Scienze della Produzione Animale, Università di Udine*

CESCHIA G., GIORGETTI G.  
*Dipartimento di Ittiopatologia, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle tre Venezie*

ADAMS S., RICHARDS R.  
*Institute of Aquaculture, University of Stirling, Scotland*

## **INTRODUZIONE**

La Pasteurellosi ittica, conosciuta anche con il nome di "Pseudotubercolosi", è una malattia provocata da *Pasteurella piscicida*, batterio Gram negativo appartenente alla famiglia delle Pasteurellaceae, che colpisce specie ittiche marine sia selvatiche che allevate. La malattia è stata segnalata per la prima volta in Italia nel 1990, con numerosi episodi in allevamenti e valli da pesca del Nord Adriatico (Ceschia et al., 1990, 1991; Doimi et al., 1991). Essa ha provocato ingenti perdite economiche nell'allevamento intensivo del branzino (*Dicentrarchus labrax*). La presente ricerca, al fine di approfondire le conoscenze sulla patogenesi e sul quadro istopatologico indotto dalla Pasteurellosi nel branzino, si propone di provocare sperimentalmente le forme acuta e cronica della malattia, monitorandole nella loro evoluzione con l'ausilio di tecniche istologiche e immunoistochimiche.

## **MATERIALE E METODI**

### **Vasche, condizioni ambientali, pesci.**

Le prove di infezione sono state condotte in vasche di 140 l nelle quali venivano mantenute le seguenti condizioni ambientali: ricambio d'acqua 1,5-

2 l/min.; ossigenazione; condizionamento termico dell'acqua in entrata (24-28° C); pH tra 8,0 e 8,4; salinità tra 33 e 38 ‰. I pesci provenivano da un allevamento intensivo presente in regione.

### **Batteri utilizzati per l'infezione.**

Ceppi di *Pasteurella piscicida* isolati da recenti episodi di malattia ed identificati mediante Galleria API come 20E200 5004, a 20-25°C.

### **Modalità di infezione.**

a) **Prima prova di immersione** (1-IM). 111 branzini di 50 g immersi in vasche contenenti sospensione batterica con titolo  $3 \times 10^5$  ufc/ml per tempi diversi: 15' (36 soggetti), 30' (38 soggetti) e 60' (37 soggetti).

b) **Seconda prova di immersione** (2-IM). 60 branzini di 70 g immersi per 30' in vasche contenenti sospensione batterica a diverso titolo:  $2.5 \times 10^3$ ,  $2.5 \times 10^2$  e  $2.5 \times 10$  ufc/ml (20 soggetti cd).

### **Reisolamento batterico.**

Da fegato, milza e rene di pesci morti spontaneamente e/o campionati durante le prove 1-IM e 2-IM sono state effettuate colture su BHA+NaCl 2% per il reisolamento di *P. piscicida*.

### **Istologia.**

Gli esami istologici sono stati effettuati su pesci morti spontaneamente e/o prelevati, secondo schemi diversificati per le 2 prove (viene considerato giorno 0 quello in cui è stata effettuata l'infezione).

**1-IM**: campionamenti a 30', 60', 6h, 10h, 23h, 34h, 4° e 5° giorno dall'infezione (2 soggetti cd.).

**2-IM**: campionamenti periodici al 19°, 69° e 84° giorno dall'infezione.

Dai pesci sono stati prelevati i seguenti organi: fegato, milza, rene anteriore, cuore, stomaco, intestino, branchie, muscolo, talora cute, cervello, gonadi e occhio. I campioni sono stati fissati in formalina tamponata al 10%, inclusi in paraffina e processati con le comuni tecniche istologiche. Sezioni di 5  $\mu$  ottenute al microtomo, sono state colorate con Ematossilina Eosina per l'osservazione al microscopio.

### **Immunoistochimica.**

Su parte delle sezioni istologiche è stata applicata una tecnica immunoistochimica per evidenziare la presenza di *P. piscicida*. La metodica in breve è la seguente: 1) incubazione con antisiero primario anti *P. piscicida*

ottenuto da coniglio (dil. 1:1000/1:3000); 2) incubazione con anticorpo biotinilato di capra anti-coniglio (DAKO, Milano) (dil.1:100); 3) trattamento con complesso avidina-biotina perossidasi (DAKO, Milano); 4) sviluppo della reazione in 3,3'- diaminobenzidina (0,04%) (Sigma, Milano).

## **RISULTATI**

### **Mortalità**

Per quanto riguarda la 1-IM tutti i pesci sono deceduti entro il 6° giorno dall'infezione. All'aumentare dei tempi di esposizione, il picco di mortalità è risultato più precoce, rilevandosi al 3°giorno per esposizione (E) = 60 min, al 4°giorno per E = 30 min, al 5°giorno per E = 15 min. Nel caso della 2-IM non è stato rilevato alcun decesso in seguito al trattamento.

### **Lesioni macroscopiche**

Nella 1-IM i branzini mostravano evidenti alterazioni macroscopiche: lamelle branchiali conglomerate e di colore chiaro, fegato con punteggiature emorragiche, splenomegalia, emorragie diffuse agli organi interni e alla cute, piccole lesioni cutanee circolari di tipo erosivo. Nel caso della 2-IM i campionamenti non hanno evidenziato alcuna lesione anatomopatologica.

### **Esame batteriologico**

Nel caso della prova 1-IM, l'esame colturale effettuato da milza, fegato e rene ha permesso di reisolare *P. piscicida*.

### **Lesioni istologiche**

Istologicamente, nel caso della prova 1-IM, 30' e 60' dopo l'esposizione i soggetti prelevati presentavano unicamente una modesta congestione splenica, cui si aggiungeva, 6 h e 10 h dopo l'infezione, un infiltrato flogistico in corrispondenza del bulbo arterioso cardiaco. 34 h dopo l'esposizione iniziava il coinvolgimento delle branchie, con iperplasia e fusione delle lamelle secondarie, e della milza, con comparsa di piccole aree necrotiche e focolai batterici al centro delle stesse. A partire dal 2° e 3° giorno fegato, rene e milza evidenziavano alcune colonie batteriche ed aree di parenchima necrotico; le lamelle branchiali presentavano modesta fusione e necrosi; inoltre si osservava sfaldamento della mucosa gastrica ed intestinale con evidenti colonie batteriche presenti anche nella sottomucosa e sierosa. Il cuore evidenziava aree necrotiche con batteri. Il cervello, fortemente

congesto, presentava focolai batterici internamente ai vasi. In concomitanza venivano rilevati piccoli focolai batterici nei muscoli scheletrici. Al 4° giorno dopo l'esposizione nella milza, nel rene e nel fegato le aree necrotiche apparivano numerose e invase da colonie batteriche; la necrosi e lo sfaldamento dell'epitelio gastrico ed intestinale risultavano imponenti. Per quanto concerne la 2-IM, dall'esame istologico condotto sugli organi di alcuni soggetti campionati 69 e 84 giorni dopo l'infezione si rilevavano alterazioni trascurabili.

### Immunoistochimica

I risultati relativi alla localizzazione immunoistochimica dei batteri vengono descritti in Tabella 1.

Tab. 1- Localizzazione immunoistochimica di *P. piscicida* negli organi dei branzini infettati.

<b>tempo intercorso dall'esposizione</b>	1-IM 10 h	1-IM 34 h	1-IM 2 giorni	1-IM 3 giorni	1-IM 4 giorni	2-IM 69 e84 giorni
milza	+	-	(*)	+	+	+
cuore	+	-	(*)	+	+	-
stomaco/intestino	++	++	+	+	+	-
fegato	-	-	+	+	+	-
rene	-	-	+	+	+	-
branchie	+	+	(*)	+	+	-
muscolo/cute	-	(*)	+	(*)	+	(*)
cervello	(*)	-	(*)	+	(*)	(*)

+ = presenza di batteri;

- = assenza di batteri;

(\*) = non testato.

### DISCUSSIONE

Nella presente indagine la mortalità riscontrata durante la prova 1-IM raggiunge i massimi livelli verso il 4° giorno; entro il 6° giorno tutti i pesci sono venuti a morte. In tempi desunti dalla letteratura, la mortalità appare dopo 3-7 giorni come nella ricciola (Wakabayashi et al., 1977) e dopo 70 h in spigole americane infettate per via intraperitoneale con  $1 \times 10^7$  cellule batteriche (Allen e Pelczar, 1967). Il quadro anatomopatologico qui riportato è assimilabile a quello desunto in letteratura in caso di Pasteurellosi acuta

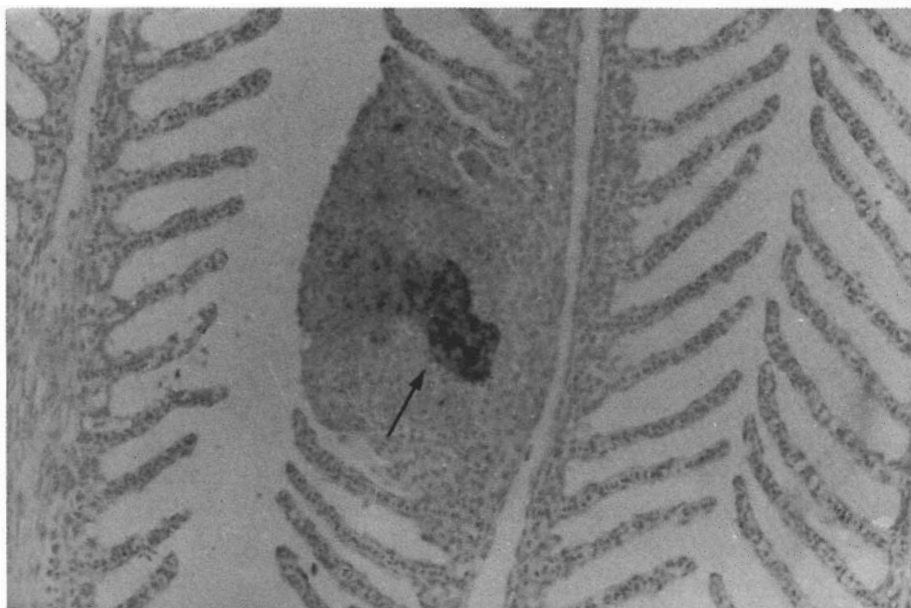


Fig. 1 - Branzino. I-IM. Branchie. Evidenziazione immunoistochimica di un aggregato batterico fortemente positivo (freccia). Immunoperossidasi. 20x.

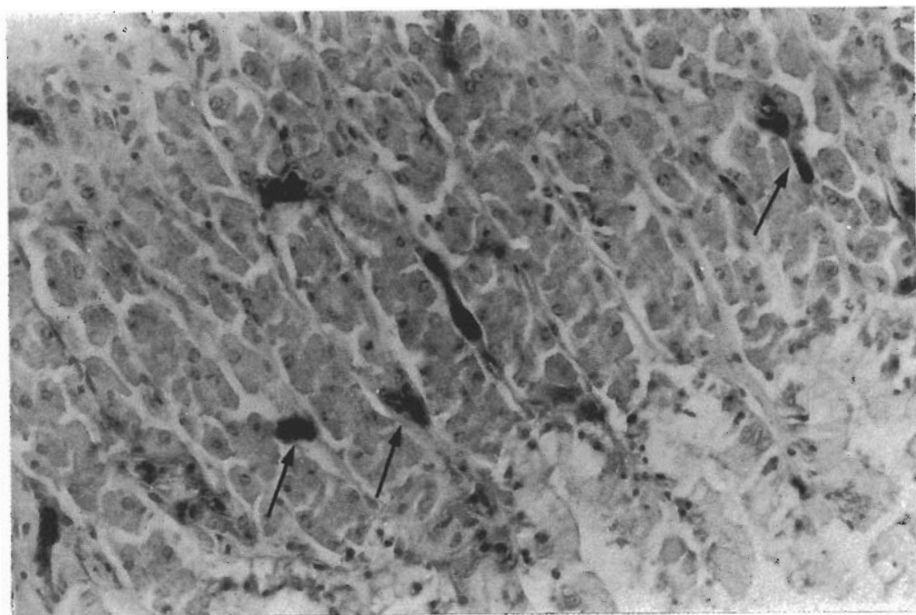


Fig. 2 - Branzino. I-IM. Stomaco. Numerosi aggregati di batteri positivi (freccie) in corrispondenza della mucosa gastrica. Immunoperossidasi. 40X.

del branzino (Ceschia et al., 1990; Quaglio et al., 1991; Santagada et al., 1991). Le lesioni cutanee di tipo erosivo, da noi descritte, sono state osservate soltanto nella ricciola giapponese da Egusa (1993), mentre nei branzini sono state evidenziate solo aree discromiche più chiare (Quaglio et al., 1991). Per quanto concerne l'evoluzione delle lesioni e la localizzazione del batterio, entro le prime 10 h dall'infezione lo stomaco, l'intestino, il cuore, la milza e le branchie sono gli organi più precocemente coinvolti. A 34 h nella milza compaiono le prime lesioni necrotiche, nelle quali però non si rinvennero batteri. Al 2° e 3° giorno si osserva la vera e propria diffusione setticemica dei batteri che vengono rinvenuti in numerosi organi, fra i quali: branchie, fegato, rene, cuore, milza, intestino, stomaco, muscolo e cervello. I fenomeni necrotici sono molto estesi. Al 4° giorno sono ancora evidenti le alterazioni branchiali, dove si osservano batteri immunopositivi, mentre nella milza si fanno più gravi le lesioni necrotiche. Questi risultati sembrano indicare nello stomaco e intestino gli organi più precocemente coinvolti dai batteri. Tali organi potrebbero costituire una importante via di entrata dell'infezione nel branzino, contraddicendo quanto precedentemente riportato da Kawahara e Kusuda (1989) nel caso della ricciola, ovvero che durante l'esposizione per immersione in sospensione batterica le branchie costituiscono la più probabile via di penetrazione dell'infezione. Nella 2-IM la situazione è stata molto diversa, infatti le basse concentrazioni batteriche utilizzate sono state incapaci di scatenare una forma acuta di malattia e non hanno determinato l'insorgenza di lesioni tipiche della forma cronica di Pasteurellosi. Appare comunque interessante il rinvenimento, 84 giorni dopo l'esposizione (Tab.1), di batteri immunopositivi all'interno di alcune cellule di tipo macrofagico nella milza. Verrebbe in tal modo dimostrata con una tecnica immunoistochimica la permanenza di *P.piscicida* in organi di pesci venuti a contatto con la malattia ed apparentemente sani. Situazione, questa, già prospettata in passato da Egusa (1993) e Nelson et al. (1989), che potrebbe confermare l'esistenza di pesci "carrier", potenzialmente molto pericolosi per la permanenza e la diffusione della malattia negli allevamenti.

### RINGRAZIAMENTI

Si ringrazia il Laboratorio di Biologia Marina di Aurisina (Trieste) per aver gentilmente fornito i locali dove è stata attuata la sperimentazione.

Si ringrazia il Sig. Pierluigi Bagatella per l'allestimento dei preparati istologici. Ricerca effettuata con fondi PIM 2ª fase - 1993 Regione Autonoma Friuli Venezia Giulia LR 27.12.89 n. 40.

## BIBLIOGRAFIA

- 1) Allen N. e Pelczar M. (1967). Bacteriological studies on the white perch (*Roccus americanus*). Chesapeake Sci. 8, 135-154.
- 2) Ceschia G., Giorgetti G. e Bovo G. (1990). Grave epizoozia da *Pasteurella piscicida* in specie eurialine del Nord Adriatico. Boll. Soc. It. Patol. Ittica; 4, 11-17.
- 3) Ceschia G., Quaglio F., Giorgetti G., Bertola G., Bovo G. (1991). Serious outbreak of pasteurellosis (*Pasteurella piscicida*) in euryhaline species along the Italian coasts. Fifth Int. Conf. "Diseases of fish and shellfish", Budapest, 26 (abstr.).
- 4) Doimi M., Quaglio F., Manfreda G. e Giorgetti G. (1991). Studies on fish pasteurellosis: an epizootic disease in venetian lagoon. E.A.F.P. Fifth Int. Conf. "Diseases of fish and shellfish", Budapest, 139 (abstr.).
- 5) Egusa S. (1983). Disease problems in Japanese yellowtail *Seriola quinqueradiata*, culture: a review. Rapp. P-V Reun. Cons. Int. Explor. Mer., 182, 10-18.
- 6) Kawahara E., Kawai K., Kusuda R. (1989). Invasion of *Pasteurella piscicida* in Tissues of Experimentally Infected Yellowtail *Seriola quinqueradiata*. Nippon Suisan Gakkaishi 55(3), 499-501.
- 7) Nelson J.S., Kawahara E., Kawai K. e Kusuda R. (1989). Macrophage infiltration in pseudotuberculosis of yellowtail. Bull. Mar. Sci. Fish. Kochl Univ.; 11, 17-22.
- 8) Quaglio F., Fucilli F., Bertola G.L. e Giorgetti G. (1991). Rassegna sulla pasteurellosi ittica. Riv. It. Acquac.; 26, 179-187.
- 9) Santagada G., Marinelli M., Latorre L., Cozzolino P. e Ceschia G. (1991). *Pasteurella piscicida*: grave episodio in un allevamento ittico della provincia di Matera. Boll. Soc. It. Patol. Ittica; 7, 32-37.
- 10) Wakabayashi H., Toyota H. e Egusa S. (1977). Artificial infection of yellowtail with a gastral administration of cultured *Pasteurella piscicida* cells. Fish Pathol.; 11, 207-211.