

ICES Identification Leaflets for Diseases and Parasites of Fish and Shellfish

Prepared under the guidance of the ICES Working Group on Pathology and Diseases of Marine Organisms

Fiches d'Identification des Maladies et Parasites des Poissons, Crustacés et Mollusques

Préparées sous les auspices du Groupe de Travail CIEM sur la Pathologie et Maladies des Organismes marins

LEAF ET NO. 54

Pasteurellosis

FICHE Nº 54

Pasteurellose

by / par

J. L. ROMALDE, B. MAGARINOS, and A. E. TORANZO

Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Biología
Universidad de Santiago de Compostela
Santiago de Compostela 15706, Spain

Edited by / Éditées par

GILLES OLIVIER

during his association with / pendant son association avec

Fisheries and Oceans Canada
Halifax, Nova Scotia, Canada B3J 2S7

INTERNATIONAL COUNCIL FOR THE EXPLORATION OF THE SEA

CONSEIL INTERNATIONAL POUR L'EXPLORATION DE LA MER

Palægade 2-4, DK-1261 Copenhagen K, Denmark / Copenhague K, Danemark

1999

ISSN 0109-2510

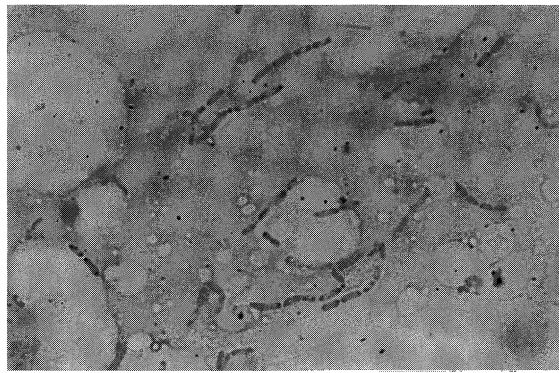


Figure 1. Cellular morphology observed in a Gram-stained kidney smear obtained from an experimentally infected fish.

Figure 1. Morphologie cellulaire de *P. piscicida* observée sur un frottis de rein provenant d'un poisson atteint de pasteurellose.

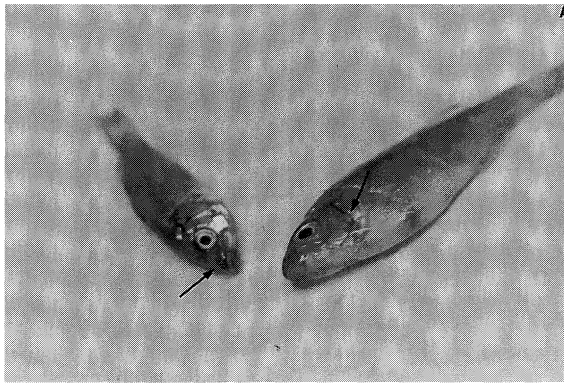


Figure 2. External macroscopic lesions in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) fingerlings during a pasteurellosis outbreak, consisting of hemorrhagic areas around the operculum, mouth, and fins (A). Internal lesions showing typical white nodules in the kidney (B).

Figure 2. Lésions macroscopiques externes chez des juveniles dedorade royale pendant une épizootie de pasteurellose. On remarque des régions hémorragiques autour de l'operculum, de la bouche et des nageoires (A). Lésions internes montrant les nodules blancs typiques au niveau du rein (B).

Pasteurellosis

Host species

Pasteurellosis has been identified in several wild fish species, including the following: white perch (*Morone americanus*), striped bass (*Morone saxatilis*), menhaden (*Brevoortia tyrannus*), and sea mullet (*Mugil cephalus*). Pasteurellosis has also been found in a wide variety of economically important mariculture species, including: yellowtail (*Seriola quinqueradiata*), ayu (*Plecoglossus altivelis*), red sea bream (*Pagrus major*), gilthead sea bream (*Sparus aurata*), sea bass (*Dicentrarchus labrax*), striped jack (*Pseudocaranx dentex*), and hybrid striped bass (*Morone saxatilis* x *M. chrisops*).

Disease name

Pasteurellosis, caused by *Pasteurella piscicida*, is a bacterial septicaemia also known as bacterial pseudotuberculosis or bacterial tuberculoidosis.

Etiology

Pasteurellapiscicida is a Gram-negative, rod-shaped, halophilic, non-motile, and facultatively anaerobic bacterium sensitive to the vibriostatic agent O/129. It often exhibits typical bipolar staining (Fig. 1) and is frequently pleomorphic, depending on the condition and age of the culture. Strains are phenotypically homogeneous; they are oxidase- and catalase-positive but negative for the production of indole, urease, gelatinase, and amylase. The optimum growth temperature of *P. piscicida* is in the range 22–30°C, although this microorganism grows between 15°C and 32°C. It is an obligate halophilic bacterium requiring a salt concentration of 1.5–2%. *P. piscicida* is serologically very homogeneous, as confirmed by serological analysis of its lipopolysaccharides (LPS) and membrane proteins. Genetic analysis of *P. piscicida* by ribotyping allows differentiation of the strains into three groups, depending on their geographical origin, which could be very useful in epidemiological studies.

P. piscicida is routinely isolated from internal organs (spleen, kidney, and liver) and several media can be used, e.g. tryptone soya agar (TSA), brain-heart infusion agar (BHIA), and blood agar, all supplemented with 2% NaCl. The incubation period is 2–4 days at 22°C. The isolates are then characterized either biochemically or serologically. For their biochemical identification, miniaturized multitest systems such as API 20E provide useful information despite the fact that this pathogen is not included in their database. The unique profile of *P. piscicida* obtained with this system is 2005004.

There is a wide range of serological methods useful for identifying *P. piscicida*, and no cross-reactions with other fish pathogens have been reported. Slide agglutination

Pasteurellose

Espèce hôte

La pasteurellose a été signalée chez plusieurs espèces de poissons marins: perche blanche (*Morone americanus*), bar d'Amérique (*Morone saxatilis*), menhaden (*Brevoortia tyrannus*) et mullet (*Mugil cephalus*). Plusieurs autres espèces de poissons marins d'importance économique pour l'aquaculture sont aussi sensibles: seriole (*Seriola quinqueradiata*), ayu (*Plecoglossus altivelis*), dorade du Japon (*Pagrus major*), dorade royale (*Sparus aurata*), bar européen (*Dicentrarchus labrax*), carangue (*Pseudocaranx dentex*), et hybride du bar d'Amérique (*Morone saxatilis* x *M. chrisops*).

Nom de la maladie

La pasteurellose dont l'agent étiologique est *Pasteurella piscicida* est une septicémie bactérienne connue aussi sous le nom de "pseudotuberculose bactérienne".

Etiologie

Pasteurella piscicida est un bacille Gram-négatif, halophile, non-motile, anaérobie facultatif et sensible à l'agent vibriostatique O/129. Suite à une coloration de Gram, cette bactérie montre souvent une coloration bipolaire caractéristique (Fig. 1), et la morphologie des bactéries est souvent pléomorphe selon les conditions ou l'âge de la culture examinée. Les souches sont phénotypiquement homogènes, et elles sont toutes oxidase- et catalase-positives mais négatives pour la production d'indole d'urease, de gélatinase et d'amylase. La température optimale de croissance se situe entre 22 et 30°C mais la bactérie peut croître entre 15 et 32°C. C'est une bactérie halophile obligatoire qui requiert de 1.5 à 2.0% de chlorure de sodium (NaCl). Des études comparatives du lipopolysaccharide (LPS) et des protéines de membrane ont démontré l'homogénéité sérologique de *P. piscicida*. Toutefois, les analyses génétiques (ribotypie) ont permis de séparer les souches en trois grands groupes selon leur distribution géographique, et ces résultats laissent entrevoir le potentiel de ces tests lors d'études épidémiologiques.

Le diagnostic est effectué par des techniques bactériologiques, prélèvement bactérien au niveau du rein, du foie ou de la rate de poissons atteints de pasteurellose. Plusieurs milieux de culture peuvent être utilisés pour isoler cette bactérie incluant les géloses "Trypticase Soy Agar", "Brain Heart Infusion Agar" ainsi que les géloses au sang; toutefois, l'addition de sel (2% NaCl) est absolument nécessaire. On incube les géloses à 22°C pendant 2 à 4 jours. Les souches sont alors caractérisées soit biochimiquement soit sérologiquement. Les systèmes miniaturisés tels que les microgaleries API 20E peuvent être utiles même si ce pathogène n'est pas inclus

tests, direct immunofluorescent assays, and latex agglutination tests are commercially available, and some of these methods allow detection of the pathogen directly in fish tissues. PCR can also be used.

Associated environmental conditions

Pasteurellosis is prevalent during the summer months. The disease is associated with high water temperatures (at least 23°C) and low salinities (20–30); environmental conditions (water quality) can also influence the outcome of the disease.

Geographical distribution

Widely distributed in several continents, North America (USA), Asia (including Japan and China), and several countries in Europe, including: France, Greece, Israel, Portugal, Spain, Italy, and Hungary.

Significance

Pasteurellosis is of great economic importance in Japan and Europe because of the huge losses that this disease causes, mainly in commercially important aquaculture species such as yellowtail, sea bream, and sea bass.

The disease was first described in wild populations of white perch and striped bass, but today a variety of marine fish species are considered as natural hosts of *P. piscicida*. The disease was responsible for important losses in cultured yellowtail in Japan and wild menhaden in Texas, USA. Starting in 1990 the disease was observed in Europe affecting mainly fingerlings of sea bass and sea bream. More recently, outbreaks have been reported in striped jack cultured in China and sea bass hybrids in Israel. Susceptibility to pasteurellosis varies between fish species and severity varies according to fish size. It has been demonstrated that fish heavier than 100 g are refractory to *P. piscicida* when sea bream and sea bass are infected. However, high mortalities caused by this pathogen have been observed in adult hybrid striped bass in the USA. The transmission and routes of infection are still unclear. Although some authors have suggested that water could not be a primary reservoir of the pathogen, due to the short survival time of *P. piscicida* in the aquatic environment, it has been recently demonstrated that this bacterium can enter into a viable but non-culturable state, which could explain horizontal transmission of the disease. Interestingly, in this non-culturable phase, *P. piscicida* maintains its pathogenic potential for fish. Other possible routes of infection are the oral route, through contaminated food, or through the gills. The existence of carrier fish has not been demonstrated.

Control

Pasteurellosis epizootics are effectively controlled by the use of antibiotics: chloramphenicol, ampicillin, or

dans les bases de données. Le profil unique de *P. piscicida* avec le système API 20E est 2005004.

Il existe plusieurs méthodes sérologiques pour l'identification de *P. piscicida* et aucune réaction croisée n'a été observée avec les autres bactéries pathogènes des poissons. Des tests et d'agglutination sur lame, d'immunofluorescence directe, d'agglutination avec les billes de latex sont tous disponibles commercialement. Certains de ces tests, incluant la méthode PCR, peuvent être utilisés pour détecter la bactérie directement dans les tissus.

Conditions de milieu

La pasteurellose est plus fréquente durant l'été. La maladie s'observe surtout lorsque la température de l'eau est au-dessus de 23°C et à des salinités faibles (20–30); les conditions du milieu (qualité de l'eau) peuvent aussi influencer le déroulement de la maladie.

Importance

La pasteurellose a un impact économique important au Japon ainsi qu'en Europe de part l'importance des pertes encourues chez les éleveurs de plusieurs espèces commerciales cultivées en mer comme la sériole, la dorade et le bar. La maladie fut d'abord signalée chez les populations sauvages de perche blanche et de bar d'Amérique, mais aujourd'hui, plusieurs espèces marines sont considérées comme les hôtes naturels de *P. piscicida*. Cette maladie est responsable de mortalités importantes dans les élevages de sériole au Japon, et dans les populations sauvages de menhaden au Texas (USA). Ce n'est qu'en 1990 que cette maladie a été signalée en Europe chez les juvéniles de bar et de dorade. Plus récemment, des épizooties ont été signalées chez le carangue cultivé en Chine et chez des hybrides de bar en Israël. La susceptibilité à la pasteurellose varie selon l'âge et la grosseur des poissons. Les dorades et les bars de plus de 100 g sont réfractaires à la maladie. Cependant, de fortes mortalités ont été observées chez des adultes hybrides du bar d'Amérique aux États-Unis.

La transmission et la voie d'infection du pathogène demeurent encore inconnues. Certains auteurs ont suggéré que l'eau ne pouvait pas être le réservoir naturel de ce pathogène puisque cette bactérie ne survit que pendant une courte période dans un environnement aquatique; cependant, des études récentes montrent que *P. piscicida* peut survivre dans l'eau sans toutefois qu'il soit possible de cultiver le germe sur les milieux de culture usuels. Cette propriété pourrait expliquer la transmission horizontale de la maladie. Il est intéressant de noter que lors de cette phase "non-cultivable", la capacité pathogénique de la bactérie est maintenue. Les poissons pourraient aussi être infectés par l'ingestion d'aliments contaminés ou bien par les branchies. L'existence de porteurs asymptomatiques n'a pas été démontrée.

oxytetracycline. It is important to note that due to the extensive use of chemotherapeutants, multiple antibiotic resistant strains have been detected in Japan. New drugs such as florfenicol, bicozamycin, and fosfomycin are being employed currently with acceptable results. It has been suggested that *P. piscicida* has an intracellular phase within the host during the infection process. Since the pathogen will be protected from the action of the antimicrobial agents this can limit the efficacy of the treatment. Several attempts were made to formulate an effective vaccine against pasteurellosis. LPS, membrane proteins, ribosomic fractions, as well as formalin inactivated cells have been tested. Although these vaccines were weakly protective by intraperitoneal injection, they were not effective by the immersion route. Recently, an ECP-enriched bacterin, when administered by immersion to 0.5 g fish, conferred good protection. Fish size has been demonstrated to be important for vaccination. The use of immunostimulants like β -1,3-glucans produced a stimulation of the non-specific immune response in sea bream and conferred acceptable protection against pasteurellosis.

Gross clinical signs

In most cases, practically no external symptoms are visible, with only small hemorrhagic foci being observed (Fig. 2A). The external clinical symptoms of the *P. piscicida* infection are darkening of the skin, abdominal distention, and, in some cases, anaemia. In chronic cases, white nodules are present in several internal organs.

Histopathology

Internally, differences can be seen between the acute and the chronic form of the disease. In the acute stage there are few pathological changes: these consist of multifocal necrosis in liver, spleen and kidney, and bacterial accumulations inside and outside macrophages, and in the interstitial spaces. The chronic lesions, in addition to the white nodules (Fig. 2B), are characterized by the presence of necrotized macrophages in the internal organs with intact bacterial cells. Gills also show a great number of degenerated macrophages with bacteria that can lead to respiratory distress.

Comments

The taxonomic position of *P. piscicida* was a matter of controversy. While some authors suggested that it should be included in the Family *Vibrionaceae* on the basis of DNA-rRNA hybridization studies, others hypothesized that it must remain within the Family *Pasteurellaceae* on the basis of chemotaxonomy and genetic studies. Recent investigations have demonstrated that the pathogen *Photobacterium piscicida* should be classified as *Ph. damsela* subsp. *piscicida*.

Prophylaxie et traitement

Les epizooties de pasteurellose peuvent être contrôlées par l'administration d'antibiotiques tels que le cloramphenicol, l'ampicilline ou l'oxytetracycline. Il faut noter que l'utilisation répétée d'antibiotiques peut causer une augmentation de la fréquence de souches multirésistantes comme cela a été constaté au Japon. L'efficacité de nouveaux antibiotiques tels que le florfenicol, la bicozamycine et la fosfomycine a aussi été rapportée. *P. piscicida* aurait une phase intracellulaire lors de l'infection, ce qui limiterait l'efficacité des traitements en protégeant le pathogène contre l'action des antibiotiques. Plusieurs essais ont été réalisés pour formuler un vaccin efficace contre la pasteurellose; parmi les vaccins testés on retrouve: lipopolysaccharide (LPS), protéines de membrane, fractions ribosomiques ainsi que des bactéries inactivées. Ces vaccins ont conféré une faible protection suite à une injection péritonéale mais sont restés inefficaces lorsqu'administrés par balnéation. Récemment, un vaccin constitué de bactéries inactivées, enrichi de produits extracellulaires (ECP), a conféré une protection efficace lorsqu'administré par balnéation à des poissons de 0.5 g. Finalement des immunostimulants tels que les glucans ont conféré une protection non-spécifique contre la pasteurellose chez la dorade.

Signes cliniques macroscopiques

Il y a généralement très peu de symptômes externes sauf de petits foyers hémorragiques (Fig. 2A). Les signes cliniques externes d'une infection à *P. piscicida* incluent: noircissement de la peau, distention abdominale et dans certains cas, anémie. Dans les cas chroniques des nodules blancs sont visibles sur plusieurs organes internes.

Histopathologie

Certaines différences peuvent être observées entre la forme chronique et la forme aiguë de la maladie. Durant la phase aiguë, il y a très peu de changements pathologiques: on observe surtout une nécrose multifocale présente dans le foie, la rate et le rein ainsi qu'une accumulation marquée de bactéries tant à l'intérieur qu'à l'extérieur des macrophages ainsi que dans les espaces interstitiels. Lorsque la condition est chronique, on observe, en plus des nodules blancs (Fig. 2B), des lésions caractérisées par la présence de macrophages nécrotiques dans plusieurs organes avec la présence de bactéries intactes. On peut aussi observer le même phénomène au niveau des branchies, ce qui peut causer des difficultés respiratoires. Les récentes investigations ont démontré que le pathogène *Photobacterium piscicida* devrait être classifié comme *Ph. damsela* sous-esp. *piscicida*.

Remarques

La position taxonomique de *P. piscicida* est encore mal définie. Certains auteurs suggèrent que cette bactérie devrait être classifiée dans la famille *Vibrionaceae* suite à

Key references

Références bibliographiques

- Hawke, J. P., Plakas, S. M., Minton, R. V., McPhearson, R. M., Snider T. G., and Guarino, A. M. 1987. Fish pasteurellosis of cultured striped bass (*Morone saxatilis*) in coastal Alabama. *Aquaculture*, 65: 193–204.
- Kubota, S. S., Kimura, M., and Egusa, S. 1970. Studies of a bacterial tuberculoidosis of the yellowtail. I. Symptomatology and histopathology. *Fish Pathol.*, 4: 11–18.
- Kusuda, R., Ninoyima, M., Hamaguchi, M., and Muraoka, A. 1988. The efficacy of ribosomal vaccine prepared from *Pasteurella piscicida* against pseudotuberculosis in cultured yellowtail. *Fish Pathol.*, 23: 191–196.
- Lewis, D. H., Grumbles, L. C., McConnell, S., and Flowers, A. I. 1970. *Pasteurella*-like bacteria from an epizootic in menhaden and mullet in Galveston Bay. *J. Wildlife Dis.*, 6: 160–162.
- Magarinos, B., Romalde, J. L., Bandín, I., Fouz, B., and Toranzo, A. E. 1992a. Phenotypic, antigenic, and molecular characterization of *Pasteurella piscicida* strains isolated from fish. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58: 3316–3322.
- Magarinos, B., Romalde, J. L., Barja, J. L., and Toranzo, A. E. 1994b. Evidence of a dormant but infective state of the fish pathogen *Pasteurella piscicida* in seawater and sediment. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60: 180–186.
- Magarinos, B., Noya, M., Romalde, J. L., Pérez, G., and Toranzo, A. E. 1994c. Influence of fish size and vaccine formulation on the protection of gilthead seabream against *Pasteurella piscicida*. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 14: 120–122.
- Robohm, R. A. 1983. *Pasteurellapiscicida*. In *Antigens of Fish Pathogens*, pp. 161–175. Ed. by D. P. Anderson, M. Dorsonand, and P. Dubourget. Collection Fondation Marcel Merieux, Lyon, France.
- Romalde, J. L., Magarinos, B., Fouz, B., Bandín, I., Nuñez, S., and Toranzo, A. E. 1995b. Evaluation of BIONOR monokits for rapid detection of bacterial fish pathogens. *Dis. Aquat. Org.*, 21: 25–34.
- Sano, M., Nakano, H., Kimura, T., and Kusuda, R. 1994. Therapeutic effect of fosfomycin on experimentally induced pseudotuberculosis in yellowtail. *Fish Pathol.*, 29: 187–192.
- Snieszko, S. F., Bullock, G. L., Hollis, E., and Boono, J. G. 1964. *Pasteurella* sp. from an epizootic of white perch (*Roccus americanus*) in Chesapeake Bay tide-water areas. *J. Bacteriol.*, 88: 1814–1853.
- Toranzo, A. E., Barreiro, S., Casal, J. F., Figueras, A., Magarinos, B., and Barja, J. L. 1991. Pasteurellosis in cultured gilthead seabream (*Sparus aurata*): first report in Spain. *Aquaculture*, 99: 1–15.

des études génomiques d'hybridation DNA-rRNA alors que d'autres maintiennent que *P. piscicida* appartient à la famille Pasteurellaceae suite aux résultats d'études génétiques et biochimiques.

Key laboratories

Laboratoires de référence

Departamento de Microbiología y Parasitología
Facultad de Biología
Universidad de Santiago de Compostela
Santiago de Compostela 15706, Spain

Fish Disease Laboratory
Faculty of Agriculture
Kochi University
Nankoku, Kochi Prefecture 783, Japan

This series is edited by / Cette série sera éditée par:

Dr Sharon E. McGladdery
Fisheries and Oceans Canada
Gulf Fisheries Centre
PO Box 5030
Moncton, N.B., Canada E1C 9B6 (E1C 5K4)