

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

LEAFLET NO. 55

Flexibacter maritimus, causal agent of flexibacteriosis in marine fish

FICHE N° 55

Fleribacter maritimus, agent etiologique de flexibacteriose chez les
poissons marins

by / par

YSABEL SANTOS, FRANCISCO PAZOS, and JUAN L. BARJA

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

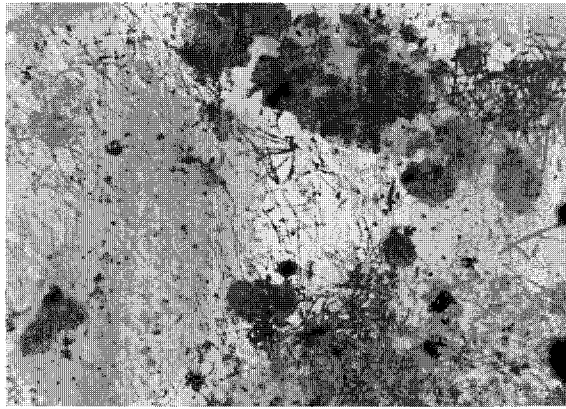


Figure 1. Gram-stained smears from ulcerative lesions of turbot (*Scophthalmus maximus*) naturally infected with *F. maritimus*.
 Figure 1. Frottis provenant de lésions ulcéraires de turbot (*Scophthalmus maximus*) naturellement contaminé par *F. maritimus*.



Figure 2. Different stages in the development of marine flexibacteriosis in turbot (*Scophthalmus maximus*).
 Figure 2. Différentes étapes du développement de flexibactériose marine chez le turbot (*Scophthalmus maximus*).

***Flexibacter mavitimus*, causal agent of flexibacteriosis in marine fish**

Host species

In Europe, *Flexibacter maritimus* has been isolated from Dover sole (*Solea solea*), sea bass (*Dicentrarchus labrax*), turbot (*Scophthalmus maximus*), Atlantic salmon (*Salmo salar*), and coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). In Japan, the disease has been reported from red sea bream (*Pagrus major*), black sea bream (*Acanthopagrus schlegeli*), and Japanese flounder (*Paralichthys olivaceous*). Recently, *F. maritimus* has been isolated in Southern California, USA, from white sea bass (*Atractoscion nobilis*), Pacific sardine (*Sardinops sagax*), and northern anchovy (*Engraulis mordax*).

Disease name

Salt water columnaris disease, marine flexibacteriosis, gliding bacterial disease of sea fish, "eroded mouth syndrome", and "black patch necrosis" are different names used to designate an ulcerative condition which produces important mortalities among marine fish species.

Etiology

Flexibacter maritimus is the causative agent of flexibacteriosis in marine fish. The organism was first isolated from cultured juvenile sea bream in Japan. The bacterium was subsequently characterized by Wakabayashi et al. (1986), who validated the species under the name *Flexibacter maritimus*. The names *Flexibacter marinus* and *Cytophaga marina* were also used to describe this species before the name *F. maritimus* was validated.

F. maritimus is a Gram-negative bacterium which forms long and slender rods (0.5 µm by 2–30 µm), and occasionally filaments up to 100 µm in length can be seen (Fig. 1). In older cultures, cells appear shorter and tend to become spherical (approximately 0.5 µm in diameter). Microcysts are absent and the bacterium is obligately aerobic. Gliding motility is a characteristic feature of all isolates. No growth occurs in medium prepared with salt (NaCl) instead of sea water, and *F. maritimus* requires two inorganic salts (KCl and NaCl) for growth. Generally, growth occurs between 15°C and 34°C (optimum growth temperature is approximately 30°C). On solid media, colonies are flat, thin, with uneven edges. In static liquid medium, surface growth is in the form of a pellicle. The organism does not hydrolyse agar, cellulose, or chitin and acid is not produced from carbohydrates. The G+C content ranged between 29% and 32.5%. The morphological, physiological, and biochemical characteristics useful in the identification of *F. maritimus* have been reported by several authors

***Flexibacter maritimus*, agent tiologique de flexibactriose chez les poissons marins**

Espèces hôtes

En Europe, *Flexibacter maritimus* a été diagnostiquée chez la sole de Douvres (*Solea solea*), le bar européen (*Dicentrarchus labrax*), le turbot (*Scophthalmus maximus*), le saumon de l'Atlantique (*Salmo salar*) et le saumon argente (*Oncorhynchus kisutch*). Au Japon, la maladie a été signalée chez la dorade rouge (*Pagrus major*), la dorade noire (*Acanthopagrus schlegeli*) et la plie japonaise (*Paralichthys olivaceous*). Récemment, *Flexibacter maritimus* a été signalée en Californie du Sud, tats-Unis, chez le bar blanc (*Atractoscion nobilis*), la sardine du pacifique (*Sardinops sagax*) et anchois nordique (*Engraulis mordax*).

Nom de la maladie

Différents noms ont été utilisés pour décrire cette condition ulcéreuse associée à d'importantes mortalités chez les poissons marins. Les termes utilisés incluent: myxobactériose d'eau de mer, flexibactériose marine ainsi que les noms Anglo-Saxons "eroded mouth syndrome" et "black patch necrosis".

Étiologie

Flexibacter maritimus est l'agent étiologique de la flexibactériose chez les poissons marins. La bactérie fut d'abord isolée au Japon chez des juveniles de dorades cultivées. Elle a ensuite été caractérisée par Wakabayashi et al. (1986) qui validèrent le nom *Flexibacter maritimus*, les noms de *Flexibacter marinus* et de *Cytophaga marina* ayant auparavant été aussi utilisés pour décrire cette espèce.

Flexibacter maritimus est un bacille Gram-négatif formant de longs et fins filaments (0.5 mm de large par 2 à 30 mm de long); on peut voir occasionnellement des filaments pouvant atteindre 100 mm de long (Fig. 1). Dans les cultures plus âgées, les cellules apparaissent plus petites et ont tendance à devenir sphériques (0.5 mm de diamètre environ). Il n'y a pas de microkystes et la bactérie est aérobique stricte. La mobilité par glissement est une caractéristique de toutes les souches. Aucune croissance n'est observée en milieu préparé avec du sel (NaCl) au lieu d'eau de mer et *Flexibacter maritimus* nécessite deux sels inorganiques (KCl et NaCl) pour sa croissance. Généralement, la bactérie peut croître entre 15 et 34°C (la température optimale de croissance est de 30°C). Sur les milieux solides, les colonies sont plates, minces avec des contours irréguliers. En milieu liquide statique, la croissance se fait en surface sous forme d'une pellicule. La bactérie n'hydrolyse ni l'agar, ni la cellulose ou la chitine et il n'y a pas de production d'acide à partir de glucides. Le taux de

(Wakabayashi *et al.*, 1986; Bernardet and Grimont, 1989; Chen *et al.*, 1995).

Although past reports suggested homogeneity among *F. maritimus* isolates, recent studies using serological and molecular typing methods have demonstrated the existence of distinct serological subgroups and ribotypes within this species.

Associated environmental conditions

F. maritimus shows a lack of strict host specificity. Although both adults and juveniles may be affected by marine flexibacteriosis, younger fish suffer a more severe form of the disease. An increased prevalence and severity of the disease has been reported at higher temperatures ($>15^{\circ}\text{C}$). In addition to water temperatures, marine flexibacteriosis is influenced by a multiplicity of environmental (stress) and host-related factors (skin surface condition). The mode of transmission and route of infection involved in this disease are still uncertain. The natural reservoirs of the pathogen are unknown, but the microorganism can be isolated from sediments and water that have been exposed to infected stocks.

Geographical distribution

Japan, USA, and several countries in Europe

Significance

Although the disease was first described in juvenile fish, marine flexibacteriosis is now considered a potentially limiting factor for the culture of many species of marine fish of commercial value in distinct geographical areas, since it can affect different stages of the production cycle.

Control

The appearance of outbreaks can be avoided or the incidence of the disease can be reduced by controlling fish densities (avoiding overcrowding), reducing stress conditions, and avoiding overfeeding. The addition of sand to the bottom of the tanks has also been reported to be effective in certain cases.

In vitro studies on the susceptibility of *F. maritimus* to different antimicrobial compounds indicate that bacterial strains isolated from different geographical areas exhibit a similar pattern, they are sensitive to chloramphenicol, tetracyclines, nitrofurans, and potentiated sulfonamides and resistant to streptomycin and to the quinolones, oxolinic acid and flumequine. On the basis of *in vivo* laboratory experiments, the administration of nitrofurans by oral or immersion methods at the early stages of the disease can be effective. Unfortunately, the use of this drug in fish farms is not permitted in the majority of countries.

G+C se situe entre 29 et 32.5%. Les caractéristiques morphologiques, physiologiques et biochimiques utilisées pour l'identification de *Flexibacter maritimus* ont été décrites par plusieurs auteurs (Wakabayashi *et al.*, 1986; Bernardet *et al.*, 1989; Chen *et al.*, 1995).

Des études antérieures suggéraient l'homogénéité des souches de *Flexibacter maritimus* mais des études récentes ont démontré, par des méthodes sérologiques et moléculaires, l'existence de sous-groupes sérologiques et de ribotypes distincts au sein de l'espèce.

Conditions du milieu

Flexibacter maritimus ne montre pas de spécificité envers son hôte. Les adultes et les juvéniles sont sensibles envers la flexibacteriose marine mais les poissons plus jeunes développent une forme plus sévère de la maladie. La fréquence et la sévérité de la maladie augmentent lorsque la température de l'eau est élevée ($>15^{\circ}\text{C}$). De plus, la flexibacteriose marine est influencée par de multiples facteurs environnementaux (stress) et reliés à l'hôte (condition de la surface de la peau). Les modes de transmission et d'infection demeurent encore incertains. Les réservoirs naturels du pathogène sont inconnus mais la bactérie peut être isolée à partir des sédiments et de l'eau qui ont été exposés à des stocks infectés.

Distribution géographique

Japon, États-Unis et plusieurs pays d'Europe.

Importance

La maladie a d'abord été décrite au Japon chez des poissons juvéniles mais la flexibacteriose est maintenant considérée comme un facteur limitant potentiel de la culture de nombreuses espèces de poissons marins à valeur commerciale dans d'autres régions géographiques et affecte différentes étapes du cycle de production.

Prophylaxie et traitement

Les épizooties de flexibacteriose marine peuvent être évitées ou l'importance de la maladie peut être réduite en contrôlant la densité des élevages de poissons (en évitant la surpopulation), en diminuant les conditions de stress et en évitant la suralimentation. On a également rapporté que l'ajout de sable au fond des tanks pouvait s'avérer efficace dans certains cas.

Des études *in vitro* sur la susceptibilité de *Flexibacter maritimus* envers différents composés antimicrobiens indiquent que les souches bactériennes isolées de différentes régions géographiques montrent les mêmes réactions: sensibles au chloramphénicol, aux tetracyclines, aux nitrofuranes et aux sulfonamides potentialisés et résistantes à la streptomycine ainsi qu'aux quinolones (acide oxolinique et flumequine). Des expériences *in vivo*

Moreover, field results are not always satisfactory even though the isolated bacteria are highly sensitive, *in vitro*, to the drug used for treating the condition. Moreover, the increasing doses of antibiotics and the high frequency of treatments can favour the appearance of resistant strains. In Spain, strains resistant to tetracycline and potentiated sulfonamides have already been isolated. At present, only a vaccine developed by the Department of Microbiology of the University of Santiago de Compostela (Spain) is available for the effective prevention of marine flexibacteriosis.

Gross clinical signs

In general, the diseased fish (juveniles or adults) have eroded mouths, ulcerated skin lesions, frayed fins, and tail rot. Infected tissue can appear pale yellow due to the presence of large number of bacteria. Some affected fish may have shallow skin lesions or darkening of tissue between caudal and marginal fin rays followed by extensive darkening of the area, loss of epithelial surface, and haemorrhage in exposed dermal tissue. Haemorrhagic jaws have also been observed in some fish. Different stages in the development of the ulcerative condition in turbot (*Scophthalmus maximus*) are illustrated in Figure 2.

Pathology

The clinical signs, along with the microscopical examination of wet mounts or Gram-stained preparations obtained from lesion material, can be used as an initial step for the diagnosis of marine flexibacteriosis. This initial diagnosis may be supported by serological methods such as fluorescent antibody techniques. However, only the isolation of the pathogen and the examination of its biochemical profile can confirm the diagnosis.

F. maritimus can be recovered from tissues of diseased fish by culture on several media, including: Anacker and Ordal Agar (Anacker and Ordal, 1959), Flexibacter maritimus medium (Pazos et al., 1993), Selective Flexibacter medium (Bullock et al., 1986), Marine Agar (MA), and Hsu-Shotts medium prepared with 50% sea water (Chen et al., 1995). Incubation is usually carried out at 25°C for 48–72 h. On most media the colonies show the typical features described for this species (pale-yellow, flat, with uneven edges), while on Marine Agar, colonies are round and yellow pigmented. Flexibacter maritimus medium has proved to be the most effective for the recovery of *F. maritimus* from field samples.

Comments

Recent findings suggest that this organism should remain as *Flexibacter maritimus* until additional genetic

en laboratoire ont montré que l'administration de nitrofuranes par voie orale ou par baignade peut être efficace au début de la maladie. Malheureusement, l'utilisation de cette chimiothérapie dans la pisciculture n'est pas permise dans la majorité des pays. En plus, les résultats sur le terrain ne sont pas toujours satisfaisants même si la bactérie isolée est très sensible, *in vitro*, à l'antibiotique utilisé. De plus, les dosages de plus en plus élevés et l'utilisation répétée d'antibiotiques peuvent causer l'apparition de souches résistantes. En Espagne, des souches résistantes à la tetracycline et aux sulfonamides potentialisés ont déjà été isolées. Actuellement, seulement le vaccin développé pour le Département de Microbiologie de l'Université de Santiago de Compostela (Espagne) est disponible pour une prévention efficace à la flexibactériose marine.

Signes cliniques macroscopiques

De façon générale, les poissons malades (juveniles ou adultes) ont la bouche abîmée, des lésions de la peau ulcérées, des nageoires effilochées et une queue en décomposition. Les tissus infectés peuvent apparaître jaune pâle par la présence de nombreuses bactéries. Certains poissons atteints peuvent présenter de petites lésions de peau ou un noircissement de tissus entre la nageoire caudale et marginale, suivies d'un noircissement important de la région affectée, de dénudement de la surface épithéliale et d'hémorragies des tissus dermiques exposés. On a également observé des mâchoires hémorragiques chez certains poissons. Différentes étapes du développement de l'ulcération chez le turbot (*Scophthalmus maximus*) sont illustrées en Fig. 2.

Histopathologie

Les signes cliniques avec l'examen microscopique de préparations humides ou de colorations de Gram obtenues à partir des lésions peuvent être utilisés comme une première étape dans le diagnostic de la flexibactériose marine. Ce premier diagnostic peut être appuyé par des méthodes sérologiques comme la technique d'anticorps fluorescents. Toutefois, seuls l'isolement du pathogène et l'examen de son profil biochimique peuvent confirmer le diagnostic. Flexibacter maritimus peut être prélevée à partir de tissus contaminés et cultivée sur des milieux tels que: Anacker and Ordal Agar (Anacker and Ordal, 1959), Flexibacter maritimus medium (Pazos et al., 1993), selective Flexibacter medium (Bullock et al., 1986), Marine Agar (MA) et le milieu Hsu-Shotts, ce milieu étant préparé avec 50% d'eau de mer (Chen et al., 1995). L'incubation se fait généralement à 25°C pendant 48 à 72 h. Sur la plupart des milieux de culture, les colonies présentent les caractéristiques typiques décrites pour cette espèce (jaune pâle, plates avec des contours irréguliers) alors

studies allow reorganization of the *Cytophaga-Flexibacter* phylogenetic branch. The species *F. maritimus* is recognized in *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Holt et al., 1994).

Key references

Références bibliographiques

- Anacker, R. L., and Ordal, E. J. 1959. Studies on the myxobacterium *Chondrococcus columnaris*. I. Serological typing. *J. Bacteriol.*, 78: 25–32.
- Bernardet, J. F., and Grimont, P. A. D. 1989. Deoxyribonucleic acid relatedness and phenotypic characterization of *Flexibacter columnaris* sp. nov., nom. rev. *Flexibacter psychrophilus* sp. nov. nom. rev. and *Flexibacter maritimus* Wakabayashi, Hikida, and Masumura 1986. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 39: 346–354.
- Bullock, G. L., Hsu, T. C., and Shotts, E. B. 1986. Columnaris disease of fishes. Fish disease Leaflet No. 72, US Department of the Interior, Fish and Wildlife Service, Division of Fisheries and Wetlands Research, Washington DC. 9 pp.
- Chen, M. F., Henry-Ford, D., and Groff, J. M. 1995. Isolation of *Flexibacter maritimus* from California. *FHS/AFS Newsletter* 22: 7–11.
- Devesa, S., Barja, J. L., and Toranzo, A. E. 1989. Ulcerative skin and fin lesions in reared turbot, *Scophthalmus maximus* (L.). *J. Fish Dis.*, 12: 323–333.
- Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T., and Williams, S. T. (eds). 1994. *In: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9th ed. Williams asumura, K., and Wakabayashi, H. 1977. Outbreak of gliding bacterial disease in hatchery-born red seabream (*Pagrus major*) and gilthead (*Acanthopagrus schlegelii*) fry in Hiroshima. *Fish Pathol.*, 12: 171–177.
- McVicar, A. H., and White, P. G. 1979. Fin and skin necrosis in cultivated Dover sole *Solea solea*. *J. Fish Dis.*, 2: 557–562.
- Pazos, F. Y., Santos, A. R., Macias, S., Nuñez, and Toranzo, A. E. 1996. Evaluation of media for the successful culture of *Flexibacter maritimus*. *J. Fish Dis.*, 19: 193–197.
- Wakabayashi, H., Hikida, M., and Masumura, K. 1986. *Flexibacter maritimus* sp. nov., a pathogen of marine fishes. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 36: 396–398.

que sur le Marine Agar, les colonies sont circulaires et jaunes. *Flexibacter maritimus* medium est le milieu de culture le plus efficace pour isoler *Flexibacter maritimus* a partir des échantillons de terrain.

Remarques

De nouvelles études suggèrent que cette bactérie devrait rester classifiée comme *Flexibacter maritimus* jusqu'à ce que d'autres études génétiques permettent de clarifier la branche phylogénétique *Cytophaga-Flexibacter*. L'espèce *Flexibacter maritimus* est reconnue dans le *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Holt et al., 1994).

Key laboratories

Laboratoires de référence

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

INRA, Laboratoire d'Ichthyopathologie, 78350 Jouy en Josas, France

Department of Fisheries, Faculty of Agriculture, University of Tokyo, Yayoi 1-1-1, Bunkyo-ku, Tokyo 113, 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)