

**Grave episodio di Ittiofonosi muscolare in *Sparus aurata*
d'allevamento: descrizione di un caso e
considerazioni igienistiche**

*Heavy muscle infection by Ichthyophonus in cultured
Sparus aurata: description of a case and
hygienic considerations*

Filippo Giarratana^{1*}, Francesco Filiciotto²

¹ Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria, Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università degli Studi di Messina, Polo Universitario dell'Annunziata – 98168 Messina. ² Dottore in Medicina Veterinaria.

RIASSUNTO - Gli autori descrivono un caso di Ittiofonosi in una orata d'allevamento off-shore, caratterizzato dalla presenza di numerose formazioni biancastre delle dimensioni di un chicco di riso in sede muscolare ed un diffuso interessamento splenico. L'esame microscopico delle lesioni rilevava trattarsi di tipici granulomi micotici Grocott positivi, Gram e Ziehl-Neelsen negativi, circondanti spore quiescenti. Commentano il caso alla luce dei nuovi regolamenti comunitari sulla sicurezza alimentare in particolare sugli adeguamenti previsti nella produzione primaria.

SUMMARY – The authors report a *Ichthyophonus* heavy infection in reared gilthead seabream. It was characterised by several small whitish nodules spread on the skeletal muscle and, especially, on the spleen. The microscopic observation showed typical mycotic granulomatous lesions, around resting spores, Grocott positive, Gram and Ziehl-Neelsen negative. Finally, the authors discuss the food safety implications in the light of the new European Regulations, especially in regard to the accomplishments for the primary production.

Key words: *Ichthyophonus hoferi*, Gilthead seabream, *Sparus aurata*, Muscle, Mariculture, Food hygiene.

* Corresponding Author: c/o Sezione di Ispezione degli Alimenti di Origine Animale, Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria, Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università degli Studi di Messina, Polo Universitario dell'Annunziata – 98168 Messina, Italy. Tel.: 090-3503762; Fax: 090-3503937; E-mail: filippogiarratana@virgilio.it

INTRODUZIONE

Nell'ambito dell'acquacoltura moderna lo scopo principale è quello di ottenere prodotti di elevata qualità e con una muscolatura che organoletticamente si avvicini il più possibile a quella dei pesci selvatici.

Lo sviluppo dell'allevamento off-shore e l'evoluzione delle tecniche mangimistiche forniscono un costante contributo nel perseguire tale obiettivo comportando pure, un contenimento dei principali stressori. Tra questi, tuttavia, per motivi spesso di natura economica, l'eccessiva densità nelle gabbie, risulta essere quello dal quale, forse, è più difficile salvaguardare i pesci e non manca di manifestarsi con episodi di immunodeficienze favorevoli all'insorgenza di malattie condizionate sostenute da vari agenti biologici. In quest'ambito, parecchio temuti sono i parassiti a ciclo diretto come diversi protozoi (*Amyloodinium*, *Ichthyophthirius*, *Cryptocaryon*, ecc.), metazoi (*Diplectanum*, *Sparicotyle*, *Pseudodactylogyrus*) e organismi quali *Dermocystidium*, *Saprolegnia* e *Ichthyophonus*.

Ichthyophonus spp. è parassita obbligato, agente eziologico dell'ittiiofonosi, una grave malattia dei pesci marini e dulciacquicoli, caratterizzata da flogosi granulomatosi sistemica.

È malattia cosmopolita, ad andamento generalmente cronico. Nei salmonidi, *Ichthyophonus hoferi* determina esoftalmo, panoftalmite, più spesso monolaterale, comparsa di piccole formazioni traslucide o nerastre sulla cute, disfacimento parziale delle pinne, anemia, emaciazione, lordosi, scoliosi e ascite (Hofer, 1893; Plehn & Mulsow, 1911; Grimaldi & Mandelli, 1962; Rucker & Gustafson, 1990).

Nelle aringhe la malattia è caratterizzata esternamente da rugosità delle squame, maggiormente nella parte caudo-ventrolaterale, colorazione scura, piccole tumefazioni e ulcere sanguinanti (Sinderman & Scatergood, 1954; Ribelin & Migaki, 1975).

Il riscontro di lesioni muscolari, in genere, non è frequente tranne che nei salmonidi, nelle aringhe e nei pleuronettidi (Sinderman & Scatergood, 1954; Timur & Timur, 1984; McVicar & McLay, 1985).

Nelle specie eurialine allevate, in particolare, l'ittiiofonosi muscolare è da considerarsi reperto a dir poco rarissimo a giudicare dai più estesi contributi presenti in bibliografia (Sitjà-Bobadilla & Alvarez-Pellitero, 1990; Athanassopoulou, 1992; Franco-Sierra *et al.*, 1997). Abbiamo, dunque, ritenuto interessante segnalare il peculiare interessamento della muscolatura in un caso di ittiiofonosi in una orata allevata.

MATERIALI E METODI

Il caso riguarda un'orata proveniente da un allevamento off-shore con gabbie sommergibili della regione Sicilia. Nel contesto di un campionamento, effettuato su 21 orate di detto allevamento e finalizzato ad altri scopi, veniva accertato che il pesce non presentava anomalie all'esame esterno, ma al momento dell'asportazione della cute si osservava, a livello della muscolatura assiale, una formazione biancastra, leggermente procidente, delle dimensioni di un chicco di riso (Foto 1). Nel corso del successivo esame approfondito della muscolatura si evidenziavano altre cinque formazioni simili alla prima variamente distribuite nella muscolatura (Foto 2). Esse presentavano una consistenza modicamente cedevole e, al taglio, aspetto granuloso.

Il successivo esame degli organi metteva in evidenza un aumento di volume della milza, sede di numerose formazioni nodulari, biancastre, di dimensioni variabili da una testa di spillo fino ad un centimetro di diametro (Foto 3). L'esame degli altri 20 soggetti non ha messo in evidenza rilievi macroscopici.

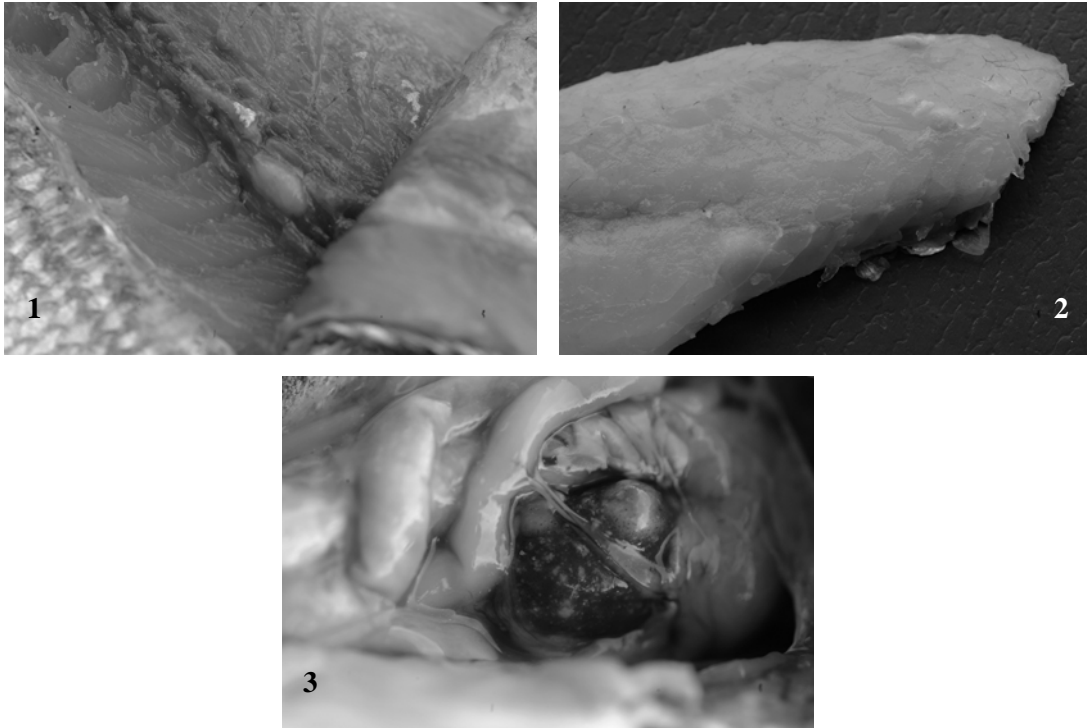


Foto 1 – Orata (*Sparus aurata*): lesione nodulare a carico della muscolatura assiale.

Foto 2 – Muscolatura di orata (*Sparus aurata*): lesioni nodulari a carico di diversi distretti muscolari

Foto 3 - Milza di orata (*Sparus aurata*): lesioni nodulari coinvolgenti l'intero organo.

Photo 1 – Gilthead seabream (Sparus aurata): nodular lesion affecting the axial muscle.

Photo 2 – Gilthead seabream (Sparus aurata) muscle: nodular lesions spread on the skeletal muscle.

Photo 3 – Gilthead seabream (Sparus aurata) spleen: nodular lesions involving the whole organ.

Porzioni di muscolatura, milza, fegato, rene, intestino, cuore, encefalo, branchie e stomaco venivano fissate in formalina tamponata al 10%, incluse in paraffina e le sezioni ottenute colorate con Ematossilina–Eosina (EE), Blu di toluidina, McManus (PAS), Grocott per i miceti, Gomori per fibre reticolari, Gram e Ziehl-Neelsen.

Le misurazioni microscopiche erano, infine, realizzate con sistema SC Casti Imaging.

RISULTATI

L'esame microscopico delle lesioni muscolari e della milza evidenziava tipici granulomi micotici Grocott positivi, Gram e Ziehl-Neelsen negativi che circondavano spore fungine di forma sferica od ovale, delle dimensioni variabili da 10 a 250 μm (Foto 4).

L'esame istologico degli altri organi non consentiva di accertare alcuna lesione se non un analogo focolaio nel contesto di un'aderenza tra sierosa intestinale ed epiplon in cui erano, tra l'altro, riconoscibili alcune cellule ovariche.

Le spore presentavano una doppia parete PAS e Grocott positiva, la cui componente esterna dai contorni piuttosto irregolari, aveva spessore relazionato alla dimensione delle

spore e quella interna costantemente sottile; tra le due strutture era evidente un esile spazio (Foto 5).

All'osservazione microscopica, il citoplasma delle spore era spesso vacuolizzato, debolmente basofilo, PAS-positivo, argirofilo e con numerosi nuclei del diametro variabile da 2 a 3,2 μm .

Il tessuto splenico mostrava notevole sovvertimento strutturale in quanto quasi completamente sostituito dai numerosi granulomi micotici circondati da cellule epitelioidi, linfociti e numerosi melanomacrofagi, quest'ultimi talvolta presenti all'interno delle spore (Foto 6).

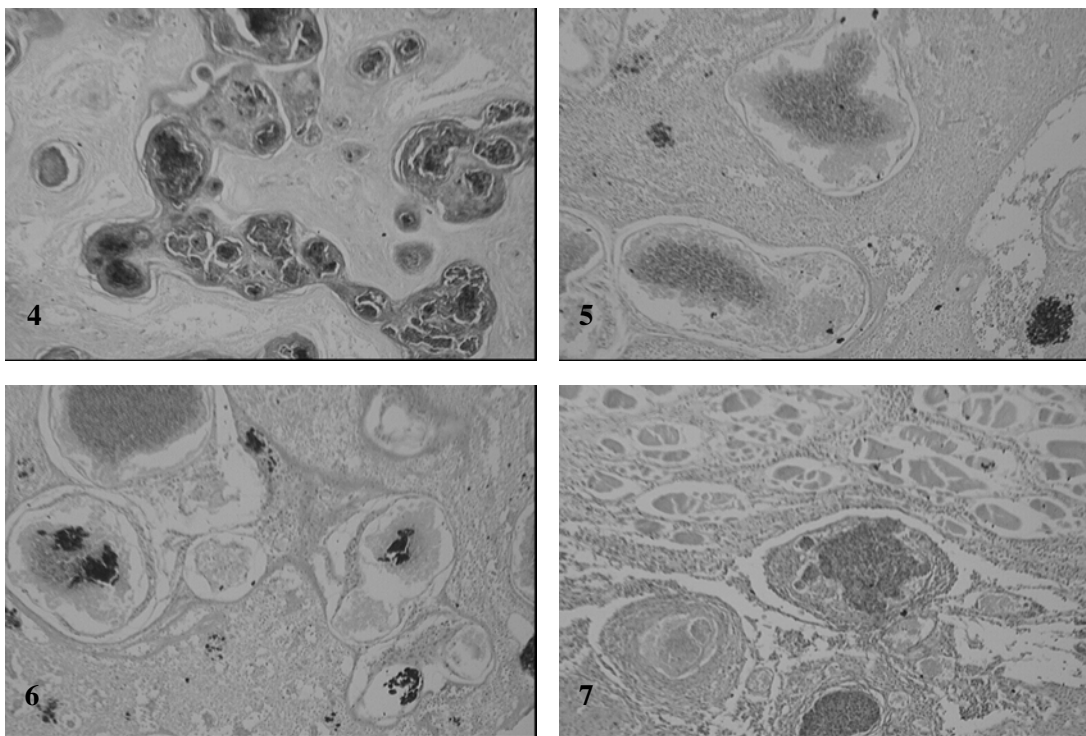


Foto 4 – Muscolatura di orata (*Sparus aurata*): tipici granulomi micotici Grocott positivi che circondano spore fungine di forma sferica od ovalare (Grocott 100x).

Foto 5 – Milza di orata (*Sparus aurata*): le spore presentano una doppia parete, delimitante, internamente, un esile spazio (PAS 100x).

Foto 6 – Milza di orata (*Sparus aurata*): notevole sovvertimento strutturale per la presenza di numerosi granulomi micotici, circondati da cellule epitelioidi, linfoidi e melanomacrofagiche (E-E 100x).

Foto 7 – Muscolatura di orata (*Sparus aurata*): presenza di granulomi micotici associata ad un esteso risentimento miofibrilare di tipo necrobiotico (E-E 100x).

Photo 4 – Gilthead seabream (*Sparus aurata*) skeletal muscle: typical mycotic granulomas Grocott positive, around oval fungal spores (Grocott 100x).

Photo 5 – Gilthead seabream (*Sparus aurata*) spleen: fungal spores with a double wall and a thin internal space (PAS 100x).

Photo 6 – Gilthead seabream (*Sparus aurata*) spleen: several granulomas bounding by epithelioid, lymphoid and melanomacrophagic cells, overthrow the normal structure (E-E 100x).

Photo 7 – Gilthead seabream (*Sparus aurata*) skeletal muscle: presence of several mycotic granulomas associated to a heavy fibre necrobiosis (E-E 100x).

Le lesioni muscolari erano anch'esse caratterizzate da analoghi quadri microscopici e da un esteso risentimento miofibrile di tipo necrobiotico (Foto 7).

In alcuni campi si evidenziavano alcune spore colte presumibilmente durante la fase germinativa (Foto 8), nella quale assumono la caratteristica forma di “fiasco”, in cui il “collo” è l'ifa in formazione.

Le caratteristiche istologiche descritte ci hanno indotto a considerare l'agente delle lesioni come riconducibile a *Ichthyophonus hoferi*.

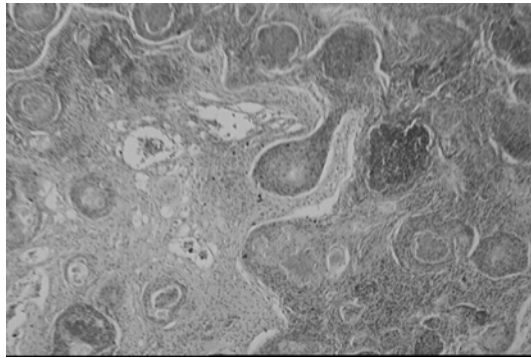


Foto 8 – Muscolatura di orata (*Sparus aurata*): spora colta presumibilmente durante la fase germinativa, nella quale assume la caratteristica forma di “fiasco” (PAS 100x).

Photo 8 – Gilthead seabream (*Sparus aurata*) skeletal muscle: mycotic spore presumably during the germinative phase when it assumes the characteristic “flask shape” (PAS 100x).

DISCUSSIONI E CONCLUSIONI

L'ittiiofonosi fu descritta per la prima volta da Hofer nel 1893, con il nome di “Taulmelkrankheit” (malattia barcollante), una forma morbosa delle trote (*Salmo trutta*) che determinava una vistosa atassia natatoria e che l'Autore considerò sostenuta da uno zooparassita. Successivamente l'eziologia della malattia barcollante fu definita da Plehn & Mulsow nel 1911, che descrissero l'agente come un fungo e lo denominarono *Ichthyophonus hoferi*.

La sua posizione tassonomica è stata a lungo discussa e controversa; recenti studi (Spanggaard *et al.*, 1994; Ragan *et al.*, 1996; Baker *et al.*, 1999; Herr *et al.*, 1999; Ustinova *et al.*, 2000) sulla filogenesi hanno raggruppato *Ichthyophonus hoferi* con *Dermocystidium*, *Psorospermium*, l'agente della malattia a rosetta dei salmonidi e *Rhinosporidium*, nei Mesomycetozoa, una classe dei Protisti.

Studi condotti su *Ichthyophonus* hanno evidenziato un incremento della prevalenza della malattia proporzionale all'età del pesce (Ruggieri *et al.*, 1970).

E' dimostrata, infatti, l'assenza della malattia negli stadi giovanili come nel caso dei cefali di peso inferiore ai 5 grammi e nei rombi e pagelli di età inferiore ai 30 giorni (Franco-Sierra *et al.*, 1997). L'infezione quindi è probabilmente indotta dall'alimento (pellet) ricevuto dopo lo svezzamento (Okamoto *et al.*, 1987). Non è però da escludere in generale la possibilità di trasmissione tramite copepodi, pesci selvatici infetti somministrati come alimento o penetrati

nelle gabbie e mediante spore indigerite eliminate dal pesce infestato (Gustafson & Rucker, 1956; Grimaldi & Mandelli, 1962; Okamoto *et al.*, 1987).

Il ruolo del pellet secco, come veicolo di *Ichthyophonus*, è stato anche confermato in un esperimento su rombo (*Scophthalmus maximus*), in cui è stata osservata una prevalenza di infezione del 70% nei pesci controllo alimentati con i normali pellets del commercio, rispetto all'assenza d'infezione nei pesci alimentati con pellets estrusi (Franco-Sierra *et al.*, 1997).

Ciò è imputabile al fatto che probabilmente le tecniche di lavorazione dei pellets secchi, a base di farine di acciughe, aringhe e sardine spesso infette, non sarebbero idonee a distruggere il fungo, nonostante sia nota la sua bassa resistenza al trattamento termico in vitro (40°C per non più di 3 minuti) (Spanggaard & Huss, 1996). In effetti il pellet secco si ottiene mediante trattamento termico variabile da 60°C a 85°C per pochi minuti rispetto al pellet estruso ottenuto con temperature fino a 200°C (Aghina & Maletto, 1979). Anche il congelamento a -45°C per 9 giorni sarebbe in grado di inattivare il parassita (Gustafson & Rucker, 1956).

Dal punto di vista ispettivo, lesioni quali quelle da noi segnalate non possono essere svelate nell'ambito dei routinari controlli organolettici. Ne deriva che esse si renderebbero visibili in seguito alla filettatura operata dal consumatore finale o dall'operatore del settore alimentare negli stabilimenti di lavorazione.

Trattandosi, nel caso specifico, di lesioni muscolari che rendono certamente inadatti al consumo umano i pesci colpiti e che, per di più, non sono macroscopicamente distinguibili (Ribelin & Migaki, 1975; Ghittino, 1985; Roberts, 1989) da altre che potrebbero rappresentare un pregiudizio igienico, ricordiamo che in base all'allegato II, capitolo IX, comma 1 del Regolamento CE n° 852 del 2004 "un'impresa alimentare non deve accettare materie prime..... se risultano contaminate, o si può ragionevolmente presumere che siano contaminate da parassiti, microrganismi patogeni o tossici, sostanze decomposte o estranee in misura tale che, anche dopo che l'impresa alimentare ha eseguito in maniera igienica le normali operazioni di cernita e/o le procedure preliminari o di trattamento, il prodotto finale risulti inadatto al consumo finale."

Di conseguenza, l'accertamento dell'ittiiofonosi da parte di quest'ultima dovrebbe comportare la restituzione della materia prima al produttore primario, il quale provvederà a perfezionare il sistema aziendale di realizzazione degli obblighi previsti all'uopo dalla succitata norma al capo II, articolo 4, comma 1. In quest'ottica, dopo gli opportuni approfondimenti sulla prevalenza e sulla tipologia della malattia nell'allevamento, nonché sull'origine dei pesci, particolarmente ripagante potrebbe essere un confronto con il produttore del mangime volto ad ottenere precise notizie sulla possibilità che quest'ultimo possa contenere ancora forme vitali di *Ichthyophonus* sp. La registrazione di tale comportamento ci pare rappresenti, nello specifico, una concreta realizzazione dei principi e degli obblighi sanciti nel c.d. "pacchetto igiene".

Infine, sotto il profilo epidemiologico, la presumibile bassa prevalenza (4,76%) dell'ittiiofonosi nell'allevamento di provenienza dell'orata descritta, contrasta notevolmente con quella elevata nota in Grecia (19,8%) (Athanasopoulou, 1992) ed ancor più con quella elevatissima rilevata in Spagna negli allevamenti dell'area del Mediterraneo (75,1%) (Franco-Sierra *et al.*, 1997).

In misura più limitata, appare pure inferiore a quella di altri allevamenti siciliani saggiati negli ultimi due anni nel contesto di diverse indagini svolte dalla Sezione di Ispezione degli Alimenti di Origine Animale, del Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria dell'Università degli Studi di Messina e non ancora pubblicati.

BIBLIOGRAFIA

- Aghina C. & Maletto S. (1979). *Tecnica mangimistica. Società Editrice Esculapio, Bologna.*
- Athanassopoulou F. (1992). Ichthyophoniasis in sea bream, *Sparus aurata* (L.), and rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), from Greece. *J. Fish Dis.*, 15: 437-441.
- Baker G.C., Beebe T.J.C. & Ragan M.A. (1999). *Prototheca richardsi*, a pathogen of anuran larvae, is related to a clade of protistan parasites near the animal fungal divergence. *Microbiology*, 145: 1777-1784.
- Franco-Sierra A., Sitjà-Bobadilla A. & Alvarez-Pellitero P. (1997). *Ichthyophonus* infection in cultured marine fish from Spain. *J. Fish Biology*, 51: 830-839.
- Ghittino P. (1985). *Tecnologia e patologia in acquacoltura, Vol. 2 – Patologia. Ed. Bono, Torino.*
- Grimaldi E. & Mandelli G. (1962). Descrizione di un grave episodio di ittiofoniasi (morbo barcollante) della trota iridea d'allevamento. *Clin. Veter.*, 85, 6: 276-289.
- Gustafson P.V. & Rucker R.R. (1956). Studies on an *Ichthyosporidium* infection in fish: transmission and host specificity. *USDI-FWS Spec. Scient. Rep. Fisher.*, 166: 1-8.
- Herr R.A., Ajello L., Taylor J.W., Arseculeratne S.N. & Mendoza L. (1999). Phylogenetic analysis of *Rhinosporidium seeberi*'s 18S small-subunit DNA groups this pathogen among members of the protactistan Mesomycetozoa clade ("DRIP"). *J. Clin. Microbiol.*, 37: 2750-2754.
- Hofer B. (1893). Eine Salmoniden- Erkrankung. *All. Fischer. – Ztg.*, 18: 168-171.
- McVicar A.H. & McLay H.A. (1985). Tissue response of plaice, haddock and rainbow trout to the systemic fungus *Ichthyophonus*. In: *Fish and Shellfish Pathology. Academic Press, London*: 329-346.
- Okamoto N., Suzuki H., Nakase K. & Sano T. (1987). Experimental oral infection of rainbow trout with spherical bodies of *Ichthyophonus hoferi* cultivated. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 53: 407-409.
- Plehn M. & Muslow K. (1911). Der Erreger "Täumelkrankheit" der Salmoniden. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Abt I*, 59: 63-68.
- Ragan M., Goggins C.L., Cawthorn R.J., Cerenius L., Jamieson A.V.C., Plourde S.M., Rand T.G., Soderhall L.K. & Gutell R.R. (1996). A novel clade of protistan parasites near the animal-fungal divergence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 11907-11912.
- Ribelin W.E. & Migaki G. (1975). *Pathology of fishes. The University of Wisconsin Press, Madison, Wisconsin.*
- Roberts R.J. (1989). *Fish pathology. Baillière Tindall, London.*
- Rucker R.R. & Gustafson P.V. (1990). An epizootic among rainbow trout. *Prog. Fish Cult.*, 15: 179-181.
- Ruggieri G.D., Nigrelli R.F., Powles P.M. & Garnett D.G. (1970). Epizootics in yellowtail flounder, *Limanda ferruginea* Storer, in the Western North Atlantic caused by *Ichthyophonus*, an ubiquitous parasitic fungus. *Zoologica*, 55: 57-62.
- Sinderman C.J. & Scatergood L.W. (1954). *Ichthyosporidium* disease of the sea herring (*Clupea harengus*). *Maine Dep. Sea Shore Fish., Res. Bull.*, 18: 1-40.

Sitjà-Bobadilla A. & Alvarez-Pellitero P. (1990). First report of *Ichthyophonus* disease in wild and cultured sea bass *Dicentrarchus labrax* from the Spanish Mediterranean area. *Dis. Aquat. Org.*, 8: 145-150.

Spanggaard B., Gram L., Okamoto N. & Huss H. (1994). Growth of the fish-pathogenic fungus, *Ichthyophonus hoferi*, measured by conductimetry and microscopy. *J. Fish Dis.*, 17: 145-153.

Spanggaard B. & Huss H.H. (1996). Growth of the fish parasite *Ichthyophonus hoferi* under food relevant condition. *Int. J. Food Sci. Tech.*, 31: 427-233.

Timur G. & Timur M. (1984). Giant-cell reaction associated with *Ichthyophonus hoferi* infection in wild plaice, *Pleuronectes platessa* L. *J. Fish Dis.*, 7: 513-514.

Ustinova I., Krienitz L. & Huss V.A.R. (2000). *Hyaloraphidium curvatum* is not a green algae, but a lower fungus; *Amoebidium parasiticum* is not a fungus, but a member of the DRIPs. *Protist.*, 151: 253-262.