

Micobatteriosi nei pesci ornamentali: risultati di cinque anni di monitoraggio

Ornamental fish Mycobacteriosis: five years monitoring

**Cristian Salogni*, Mariagrazia Zanoni, Maria Lodovica Pacciarini,
Danila Gelmetti, Silvia Tagliabue, Giovanni Loris Alborali**

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, Via A. Bianchi, 9 - 25100 Brescia

RIASSUNTO - Scopo del lavoro è stato quello di valutare la prevalenza d'infezione sostenute da micobatteri, in pesci ornamentali marini e d'acqua dolce pervenuti al Laboratorio di Ittiopatologia dell'IZSLER nel quinquennio 2001-2005. Un totale di 186 pesci ornamentali, d'acqua dolce e salata, appartenenti a specie diverse e provenienti da partite destinate al libero commercio sono stati sottoposti ad esame necroscopico, parassitologico e culturale. L'esame culturale era finalizzato all'isolamento dei micobatteri, seguito dalla caratterizzazione biochimica e dal sequenziamento del 16S rRNA degli isolati. Il protocollo definito, veniva integrato con l'esame istologico ogni qualvolta erano presenti lesioni macroscopiche suggestive di infezione da micobatteri. Nel 41,9% dei casi (78/186) l'esame culturale è risultato positivo. Di questi solo il 6,4% (5/78) presentava lesioni nodulari; il 93,6 % (73/78) invece ne era privo. I ceppi più frequentemente riscontrati sono stati *Mycobacterium marinum* (13/186), *M. nonchromogenicum* (11/186), *M. farcinogenes* (10/186), *M. fortuitum* (8/186) e *M. fortuitum* complex (8/186). Altri micobatteri isolati sono stati, *M. chelonae* (6/186), *M. gordonae* (5/186), *M. peregrinum* (4/186), *M. terrae* complex (4/186), *M. triplex* (1/186), *M. avium* complex (1/186). Non è mai stato isolato *M. tuberculosis* complex. Tale molteplicità di riscontri suggerisce l'importanza della modalità di campionamento. Molto spesso infatti le esigue dimensioni dei campioni analizzati comportano inevitabili contaminazioni microbiche. Conseguentemente la tipizzazione della specie di micobatterio isolato rappresenta un elemento cardine nell'individuazione dei microrganismi patogeni per i pesci, nonché di quelli dotati di potere zoonosico.

SUMMARY - The aim of this study was to evaluate the prevalence of mycobacterial infection in ornamental fish brought to the Brescia State Diagnostic laboratory of ichthyopathology (IZSLER) for examination during the years 2001–2005. A total of 186 fish samples (freshwater and saltwater species), derived from regular trade were examined. The samples were analyzed for detection of Mycobacterium together with routine exams (microscopy, parasitological and cultural). Histological examination only on organs with evident macroscopic lesions was carried out. The mycobacteria detected via cultural exam were identified through biochemistry assay, PCR and 16S rRNA sequencing. We found a high percentage of positive samples (41,9%, 78/186), even through the presence of lesions was an occasional event (6,4%, 5/78). The identification has revealed several species: *Mycobacterium marinum* (13/186), *M. nonchromogenicum* (11/186), *M. farcinogenes* (10/186), *M. fortuitum* (8/186) and *M. fortuitum* complex (8/186). Other mycobacteria detected were *M. chelonae* (6/186), *M. gordonae* (5/186), *M. peregrinum* (4/186), *M. terrae* complex (4/186), *M. triplex* (1/186), *M. avium* complex (1/186). *Mycobacterium tuberculosis* complex was never isolated. The high prevalence of the infection in ornamental fish and the numerous different mycobacterial species isolated, suggest that contamination of the samples with skin and gut saprophytic mycobacteria was likely and underscore the need for careful procedures to identify the pathogenic species as well as those with a zoonotic potential.

Key words: Mycobacteriosis, *Mycobacterium* infection, Ornamental fish.

* Corresponding Author: c/o Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Via A. Bianchi, 9 - 25124 Brescia; Tel.: 030-2290271; Fax: 030-2290552; E-mail: brescia@bs.izs.it.

INTRODUZIONE

Gli episodi di micobatteriosi nei pesci sono imputabili a più specie di micobatteri. Quelle più frequentemente isolate sono: *Mycobacterium marinum*, *M. fortuitum* e *M. chelonae* (Noga, 1996; Florio *et al.*, 2003) responsabili di patologia e lesioni nelle specie ittiche infette nonché di potere zoonosico. Altri micobatteri segnalati in campo ittico, il cui ruolo patogeno non è stato tuttavia completamente chiarito sono *M. gordonae*, *M. scrofulaceum*, *M. simiae*, *M. terrae*, *M. peregrinum* e *M. poriferae* (Lansdell *et al.*, 1993; Bozzetta *et al.*, 1995; Tortoli *et al.*, 1996; Mohny *et al.*, 1998; Prearo *et al.*, 2004). Le micobatteriosi sono state rilevate in un ampio numero di specie acquatiche (Austin & Austin, 1993) in tutto il mondo, sia in pesci d'allevamento (ornamentali o alimentari) che selvatici, d'acqua dolce o salata (Ghittino 1985). Le specie ornamentali, tuttavia, a causa del diffuso commercio, sono allevate intensivamente e risultano particolarmente esposte al rischio di infezione (Florio *et al.*, 2003; Lescenko *et al.*, 2003).

La sintomatologia ed il quadro anatomopatologico possono essere influenzati da eventi stressanti quali il trasporto, la manipolazione, l'elevata densità d'allevamento e condizioni ambientali poco idonee alla specie allevata (Frerichs, 1993).

L'infezione può passare per lungo tempo inosservata in quanto paucisintomatica. I casi conclamati sono caratterizzati da letargia, esoftalmo bilaterale, lepidortosi, distensione addominale, respirazione accelerata, nuoto incoordinato, deformità scheletriche, emorragie, necrosi, tumefazioni ed ulcerazioni cutanee. La mortalità è tipicamente a stillo (Roberts, 1990; Prearo *et al.*, 2002). Nei pesci, le lesioni macroscopiche sono caratterizzate dalla comparsa di noduli di varie dimensioni, grigiastri con localizzazione prevalentemente epatica, splenica e renale (Noga, 1996; Prearo *et al.*, 2002). Le lesioni macroscopiche non sono tuttavia patognomoniche e la diagnosi differenziale con la nocardiosi, la pseudotubercolosi ittica, le micosi sistemiche e le neoplasie va sempre posta (Ghittino, 1985; Roberts, 1990).

Alcuni micobatteri isolati da pesci possono avere carattere zoonosico. Nell'uomo, *M. marinum*, responsabile del così detto "granuloma da piscina", è il micobatterio più frequentemente isolato. La lesione, un nodulo dermico, colpisce soprattutto i frequentatori di piscine e gli operatori del settore acquaristico. L'infezione si instaura per via percutanea attraverso il contatto con acqua o materiale organico infetti (Giavenni, 1981; Amerio *et al.*, 1990). Anche *M. chelonae* e *M. fortuitum* sono stati associati ad infezioni cutanee umane (Shafer & Sierra 1992; Campo Dall'Orto *et al.*, 2003). Negli individui immunodepressi (Ristola *et al.*, 1999) oppure in quelli molto giovani (Parent *et al.*, 1995) la malattia può anche generalizzare. Lo scopo del presente lavoro è stato quello di valutare la prevalenza d'infezione sostenute da micobatteri in pesci ornamentali marini e d'acqua dolce pervenuti al Laboratorio di Ittiopatologia dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna (IZSLER) di Brescia nel quinquennio 2001-2005.

MATERIALI E METODI

Durante il quinquennio 2001-2005 sono stati esaminati 186 pesci ornamentali d'acqua dolce e salata pervenuti al Laboratorio di Ittiopatologia della Sezione Diagnostica dell'IZSLER di Brescia (Tabella 1). Tutti i pesci provenivano da partite di animali in libero commercio, oppure da vasche di acquariofili. Di questi, 83 erano costituiti da pesci ornamentali tropicali d'acqua dolce (*Corydoras* sp., *Melanochromis auratus*, *Moenkhausia pittieri*, *Moenkhausia columbiae*; *Petitella* sp., *Poecilia reticulata*, *Pristella maxillaris*, *Pterophyllum scalare*, *Symphysodon discus*, *Trichogaster trichopterus*, *Xiphophorus helleri*,

Xiphophorus maculatus), 96 da ornamentali d'acqua fredda (*Carassius auratus*, *Cyprinus carpio* var. *koi*) e 7 da pesci marini ornamentali tropicali (*Abudefduf* sp., *Amphiprion* sp., *Dascyllus* sp., *Pomacanthus* sp., *Pomacentrus* sp.).

ANNO	Campioni esaminati					Campioni con lesioni (specifiche) macroscopiche					Esame colturale positivo					Totale	
	2001	2002	2003	2004	2005	2001	2002	2003	2004	2005	2001	2002	2003	2004	2005	esaminati	positivi
Dolce tropicale	6	12	29	3	33	0	1	0	0	2	0	11	16	0	18	83	45
Dolce acqua fredda	11	7	10	30	38	0	0	0	0	1	3	2	1	7	14	96	27
Marino tropicale	0	1	1	0	5	0	0	0	0	1	0	1	1	0	4	7	6
TOTALE	17	20	40	33	76	0	1	0	0	4	3	14	18	7	36	186	78
%						6,4%					18%	70%	45%	21%	46%		41,9%

Tabella 1 - Campioni esaminati per ricerca micobatteri.
Table 1 - Samples processed for mycobacterium detection.

Ogni campione, costituito da un numero variabile da 1 a 10 esemplari omogenei per specie ittica o per provenienza, è stato sottoposto ad esami di laboratorio routinari (anatomopatologico, parassitologico, batteriologico e in alcuni casi virologico). Si è poi provveduto a prelevare dei pool di organi quali il fegato, il rene e la milza nel caso i cui le dimensioni degli esemplari non superassero i 6 centimetri di lunghezza, l'intero pacchetto viscerale se fra i 4 e i 6 centimetri e il pesce in toto se di taglia inferiore ai 4 centimetri. Il pool così ottenuto è stato mantenuto refrigerato (4-6°C) o congelato (-18°C) fino all'esecuzione dell'esame colturale. Nel caso di evidenza, durante l'esame anatomopatologico, di lesioni sospette si è effettuata anche l'esame istologico e la colorazione di Ziehl-Neelsen (acido-alcool resistenza).

Esame colturale

I campioni sono stati sminuzzati sterilmente in 10 ml di soluzione fisiologica, quindi omogenizzati con lo stomacher. Un'aliquota di 2 ml di omogenato è stata decontaminata con l'aggiunta di 2 ml di NaOH al 4% e messa ad incubare a 30°C per 30 minuti. I campioni sono stati poi neutralizzati con 0,6 ml di una soluzione composta da 0,1 ml bromocresolporpora al 6%, 13 ml di acido fosforico all'85% ed acqua distillata q.b. a 100 ml. Successivamente è seguita una centrifugazione e, dopo aver eliminato il surnatante, sono stati aggiunti circa 2 ml di tampone fosfato a pH 6,8.

Il campione così preparato è stato poi seminato su terreni solidi a base d'uovo (Löwestein-Jensen e Stonebrink) e liquidi selettivi per i micobatteri (Middlebrock 7H9), secondo metodi standard (O.I.E., 2000). Contemporaneamente è stata eseguita la verifica di non contaminazione da altri microrganismi. L'incubazione è stata effettuata a 22°C e 37°C in aerobiosi per i terreni solidi e a 37°C per i liquidi.

Periodicamente è stato controllato l'eventuale sviluppo di colonie sospette su terreni solidi, sulla base del loro aspetto e dell'eventuale produzione di pigmento. Su di esse è stata effettuata la colorazione di Ziehl-Neelsen. L'esame si considerava concluso con esito negativo dopo 40 giorni senza che vi sia stata una evidenza di crescita batterica.

Accanto ai sistemi colturali tradizionali basati sull'utilizzo di terreni solidi è stato affiancato un sistema automatizzato BACTEC MGIT 960 (Becton Dickinson Diagnostic Instruments System, Md, USA), basato sull'utilizzo di terreni liquidi quali il Middlebrook 7H9 addizionati di fluorocromo (Jayakumar *et al.*, 2001; Scarparo *et al.*, 2002). Lo sviluppo di micobatteri viene rilevato automaticamente dal sistema come comparsa di fluorescenza.

Tipizzazione

Gli isolati micobatterici sono stati sottoposti a caratterizzazione fenotipica tramite test biochimici e colturali indicati nella Tabella 2 (Metchock *et al.*, 1999; Carter & Wise, 2004).

L'indagine genetica ha previsto l'impiego della PCR secondo Kulski *et al.* (1995) che utilizza 3 coppie di primers che permettono l'amplificazione di sequenze targets in grado di caratterizzare i ceppi a livello di genere (*Mycobacterium*) e a livello di specie (*Mycobacterium tuberculosis* complex e *Mycobacterium avium*).

I prodotti PCR ottenuti sono stati quindi esaminati in gel d'agarosio al 2%.

Il campione risultato positivo alla PCR per il genere *Mycobacterium*, ma negativo a quello per *MT* complex e *Mycobacterium avium*, è stato sottoposto a sequenziazione dell'rRNA 16S mediante kit Microseq 500 (Applied Biosystem) (Patel *et al.*, 2000). Il prodotto PCR amplificato è stato poi purificato con l'ausilio del Qiaquick purification kit (Qiagen) e quindi impiegato nella PCR cycle sequencing, che permette di intercalare composti fluorescenti al prodotto PCR.

Esame istologico

Porzioni di fegato, rene, milza e cute, sono stati fissati in formalina tamponata al 10%, disidratati ed inclusi in paraffina secondo le comuni metodiche istologiche. Sezioni al microtomo di 3 µm sono state colorate con Ematossilina-Eosina e Ziehl-Neelsen.

Tempo richiesto per la crescita
Produzione di pigmento e morfologia delle colonie
Crescita a 30°C, 37°C, 42°C
Inibizione da Idrazide dell'acido tiofen-2-carbossilico (T2H)
Riduzione del tellurito
Produzione di ureasi
Deaminazione della pirazinamide (pirazinamidasi)
Tolleranza a NaCl (5%)
Crescita su agar McConkey senza cristalvioletto
Produzione di niacina
Idrolisi del Tween 80
Riduzione dei nitrati
Incorporazione del ferro
Arilsulfatasi (tempo richiesto)
Produzione di catalasi termostabile

Tabella 2 - Esami colturali e biochimici eseguiti per la tipizzazione dei micobatteri atipici.
Table 2- Cultural and biochemical parameters used to type the isolates atypical mycobacteria.

RISULTATI

Esame anatomopatologico ed istologico

Nel 6,4% (5/78) dei casi sono state riscontrate lesioni macroscopicamente evidenti (Figura 1); da queste lesioni sono stati isolati *M. marinum* (4/78) e *M. fortuitum* (1/78) e l'esame istologico ha evidenziato granulomi multipli con centri necrotici (Figura 2). Il materiale necrotico, nei noduli ad uno stadio di sviluppo più avanzato, si disponeva in strutture simil-lamellari concentriche.

Gruppi di bacilli acido-alcool resistenti sono stati osservati frammisti al materiale necrotico o disposti alla periferia della lesione. Nei restanti animali non erano osservabili alterazioni significate.

Esame colturale e tipizzazione

Nel 41,9% dei casi (78/186) l'esame colturale è risultato positivo. I ceppi riscontrati sono stati *M. marinum* (13/186), *M. nonchromogenicum* (11/186), *M. farcinogenes* (10/186), *M. fortuitum* (8/186) e *M. fortuitum* complex (8/186). Altri micobatteri isolati sono stati *M. chelonae* (6/186), *M. gordonae* (5/186), *M. peregrinum* (4/186), *M. terrae* complex (4/186), *M. triplex* (1/186), *M. avium* complex (1/186) (Figura 3).

In 7 casi non si è raggiunta l'identificazione di specie, pur escludendo tuttavia l'appartenenza di tali isolati al *M. tuberculosis* complex e *M. avium* complex. In alcuni casi non è stato possibile, a causa della non completa concordanza fra la tipizzazione biochimica e molecolare, andare oltre all'appartenenza al *M. fortuitum* complex, *M. terrae* complex ed *M. avium* complex (rispettivamente per 8, 4 e 1 isolamento). In tali casi le prove biochimiche che maggiormente hanno evidenziato variazioni rispetto a quanto riportato dalla bibliografia sono state la velocità di crescita, la tolleranza al NaCl (5%) e la produzione della catalasi termostabile.



Figura 1 - Pesce rosso (*Carassius auratus*) con numerose lesioni granulomateose viscerali.
Figure 1 - Goldfish (Carassius auratus) with numerous visceral granulomas lesions.

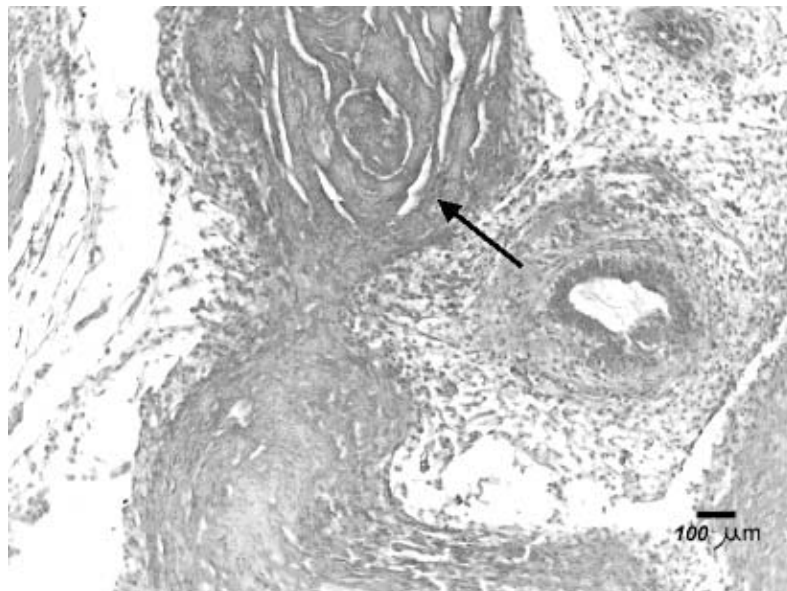


Figura 2 - Lesione granulomatosa della sierosa celomatica da *Mycobacterium* sp. in pesce rosso (*Carassius auratus*) (Ematossilina-Eosina).
Figure 2 - Granulomatous lesions by Mycobacterium sp. in coelomatic serosa of goldfish (Carassius auratus)(H-E).

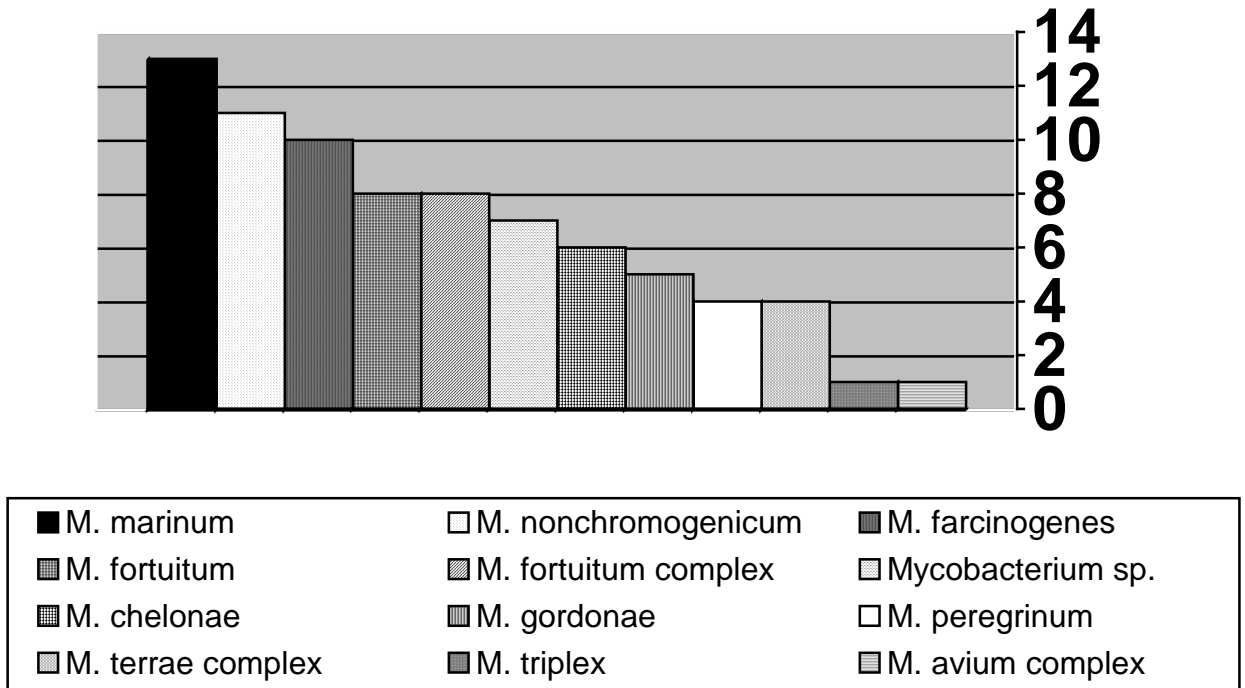


Figura 3 - Numero di campioni positivi per specie di micobatterio.
 Figure 3 - Number of positive samples for Mycobacterium species.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Le indagini di laboratorio eseguite hanno permesso di individuare un'elevata prevalenza (41,9%) di campioni positivi ai micobatteri nei pesci ornamentali confermando quanto già riscontrato da altri autori (Florio *et al.*, 2003; Prearo *et al.*, 2004). Tali risultati sono ancora più significativi e preoccupanti se si considera la bassa incidenza (6,4%) di sintomatologia, mortalità o lesioni tipiche macroscopicamente evidenti.

In merito all'esame colturale è stato evidenziato come il sistema tradizionale sia da preferirsi rispetto a quello automatico MGIT 960; sui terreni solidi a base d'uovo (Löwenstein-Jensen e Stonebrink) si è avuto l'isolamento del 100% dei micobatteri, mentre con il sistema automatico la percentuale di isolamento è stata inferiore, soprattutto per alcune specie (*M. nonchromogenicum* 55% - 6/11; *M. marinum* 61% - 8/13; *M. terrae* complex 75% - 3/4), mentre per le altre non si sono rilevate differenze significative.

La speciazione dei micobatteri si è dovuta avvalere di metodiche tradizionali, ma tuttora ancora valide, quali gli esami colturali e biochimici, in quanto l'utilizzo esclusivo delle tecniche diagnostiche molecolari più moderne (sequenziamento del gene 16S rRNA) non si è dimostrato sempre adatto a tale scopo (Ucko *et al.*, 2002).

In merito alle specie isolate è da segnalare come accanto a quelle classicamente descritte in campo ittico (*M. marinum*, *M. fortuitum*, *M. chelonae*), ne sono state identificate con una certa prevalenza delle altre come *M. peregrinum* (patogeno), *M. farcinogenes* (patogeno o potenzialmente tale), *M. gordonae* e *M. terrae* complex (saprofiti, il cui ruolo patogeno è dubbio). Tutti i micobatteri isolati, volendo far riferimento alla classificazione di tipo clinico-patologica di Rastogi *et al.* (2001), sono ascrivibili, con la sola eccezione di un isolamento di *M. avium* complex, ai MOTT (Mycobacteria Other Than Tuberculosis, non *M. avium* complex e non *M. tuberculosis* complex). Non è mai stata dimostrata la presenza di micobatteri appartenenti al *Mycobacterium tuberculosis* complex. Tale molteplicità di riscontri suggerisce l'importanza della modalità di campionamento. Molto spesso infatti le esigue dimensioni dei campioni analizzati comportano inevitabili contaminazione microbiche (micobatteri saprofiti o ambientali) dei prelievi con materiale intestinale e/o cutaneo. Conseguentemente la tipizzazione della specie di micobatterio isolato rappresenta un elemento cardine nell'individuazione di microrganismi patogeni per i pesci nonché di quelli dotati di potere zoonosico.

BIBLIOGRAFIA

- Amerio P., Carmenini S., De Mori F. & Santone R. (1990). Micobatteriosi atipica da *Mycobacterium marinum*. *Gior. Ital. Dermatol. Venereol.*, 125: 147-149.
- Austin B. & Austin D.B. (1993). Bacterial fish pathogens disease in farmed and wild fish. *Ellis Horwood, Chichester, England*.
- Bozzetta E., Prearo M., Penati V., Pungkachonboon T. & Ghittino C. (1995). Isolamento e tipizzazione di micobatteri in pesci tropicali d'allevamento. *Boll. Soc. It. Patol. Ittica*, 16: 13-21.
- Campo Dall'Orto B., Penati V., Florio D., Pavoletti E., Zanoni R.G. & Prearo M., (2003). Micobatteriosi ittiche, patologie emergenti e dominanti in pesci ornamentali. *Boll. Soc. It. Patol. Ittica*, 38: 36-46.
- Carter G.R. & Wise D.J. (2004). Essentials of veterinary bacteriology and mycology. 6th Ed. *Oxford Iowa State press*: 290 pp.
- Florio D., Lozito P., Fioravanti M.L., Prearo M. & Zanoni R.G. (2003). Micobatteriosi nei pesci ornamentali d'importazione. *Boll. Soc. It. Patol. Ittica*, 38: 28-35.
- Frerichs G.N. (1993). Mycobacteriosis and nocardiosis. In: *Inglis V., Roberts R.I. & Bromage N.R.*. "Bacterial Disease of Fish". *Blackwell Scientific Publication, Oxford. UK.*: 219-233.
- Ghittino P. (1985). Tecnologia e patologia in acquacoltura, vol. II - Patologia. *Ed. Bono, Torino*: 444 pp.
- Giavenni R. (1981). Micobatteri: un pericolo per i pesci ma anche per l'uomo. *Aquarium*, 10: 534-539.
- Jayakumar K., Forster V.T. & Kyi M.S. (2001). Improved detection of *Mycobacterium* spp. using the Bactec MGIT 960 system. *Br. J. Biomed. Sc.*, 58: 154-158.

Shafer R.W. & Sierra M.F. (1992). *Mycobacterium xenopi*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium kansasii*, and other non tuberculosis mycobacteria in a area of endemicity for AIDS. *Clin. Infect. Dis.*, 15, 2: 161-162.

Tortoli E., Bartolini A., Bozzetta E., Burrini C., Mantella A., Penati V., Simonetti M.T. & Ghittino C. (1996). Identification of the newly described *Mycobacterium poriferae* from tuberculosis lesions of snakehead fish (*Channa striatus*). *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, 19, 1: 25-29.

Ucko M., Colorni A., Kytt H., Diamant A., Zlotkin A. & Knibb W.R. (2002). Strain variation in *Mycobacterium marinum* fish isolates. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, 1: 5281-5287).