

**Infezione da *Mycobacterium marinum*:
descrizione di un focolaio di malattia in trota iridea
(*Oncorhynchus mykiss*) e trota fario (*Salmo trutta*)
d'allevamento**

*Outbreak of Mycobacterium marinum in farmed rainbow trout
(Oncorhynchus mykiss) and brown trout (Salmo trutta)*

**Cristian Salogni^{1*}, Mariagrazia Zanoni¹, Mario Covi²,
Maria Lodovica Pacciarini¹, Giovanni Loris Alborali¹**

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, Via A. Bianchi, 9 - 25100 Brescia; ² ASL Brescia. Distretto Veterinario di Orzinuovi, via Donzelli, 43 - 25034 Orzinuovi (BS).

RIASSUNTO - Nel presente lavoro viene descritto un focolaio di micobatteriosi ittica da *Mycobacterium marinum* in riproduttori di trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*) e trota fario (*Salmo trutta*) allevati intensivamente in un impianto di acquacoltura di fondo valle del Nord Italia. La patologia era in generale paucisintomatica. I rari casi conclamati erano caratterizzati da dimagrimento, desquamazioni e ulcere cutanee.

Gli esemplari pervenuti al laboratorio sono stati sottoposti ad esame anatomopatologico che evidenziava la presenza di lesioni nodulari grigiastre, di dimensioni variabili, da pochi millimetri ad un centimetro, localizzate prevalentemente in sede epatica, splenica, renale e branchiale.

I campioni sono stati inoltre sottoposti ad esami routinari parassitologici microscopici, colturali, micologici e virologici. Sugli organi con lesioni si è eseguito l'esame istologico.

La ricerca dei micobatteri, da pool di organi (fegato, rene e milza), effettuata su terreni specifici solidi a base d'uovo (Löwenstein-Jensen e Stonebrink) ha consentito l'isolamento di *Mycobacterium marinum* identificato come tale, grazie a caratterizzazione biochimica e genomica (PCR e sequenziamento rRNA 16s).

L'esame istologico ha consentito di individuare il carattere granulomatoso delle lesioni riscontrate, nonché la presenza di batteri alcool-acido resistenti.

La distruzione di tutti i pesci allevati, unitamente a un vuoto sanitario protratto e ad un'accurata operazione di disinfezione ha evitato la ricomparsa della malattia.

SUMMARY - This article describe an infection of *Mycobacterium marinum* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and brown trout (*Salmo trutta*) broodstocks farmed in the North of Italy. Only few fishes presented symptoms as wasting, desquamations and skin ulcers. The fishes revealed greyish nodular lesions localized into the liver, spleen, kidney and gills.

Parasitological, bacteriological, mycological and viral exams have been executed. Moreover on the samples with lesions had been executed histological exams.

Pooled organs (liver, spleen and kidney) had been analysed to detect mycobacteria on specific egg yolk medium (Löwenstein-Jensen and Stonebrink). *Mycobacterium marinum* had been isolated and identified by biochemistry assay, PCR and sequencing rRNA 16s. The histological exams found granulomatous lesions and bacteria positive to Ziehl-Neelsen stain.

In the farm all fishes were stamped out, and a carefully protocol of disinfection was applied. These operations had avoided the reappearance of the disease.

Key words: Trout mycobacteriosis, Rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, Brown trout, *Salmo trutta*, *Mycobacterium marinum*.

* Corresponding Author: c/o Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Via A. Bianchi, 9 - 25124 Brescia; Tel.: +39 030-2290271; Fax: +39 030-2290552; E-mail: cristian.salogni@bs.izs.it.

INTRODUZIONE

La prima segnalazione di micobatteriosi in salmonidi è stata descritta da Earp *et al.*, nel 1953; tuttavia l'infezione è stata rilevata 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). In modo particolare la malattia è stata descritta in specie alimentari allevate come il branzino (*Dicentrarchus labrax*) (Colorni, 1992), striped bass (*Morone saxatilis*) (Hedrick *et al.*, 1987), yellowtail (*Seriola quinqueradiata*) (Kusuda *et al.*, 1987), salmoni del Pacifico (*Oncorhynchus* sp.) (Ashburner, 1977; Arakawa & Fryer, 1984) e salmone atlantico (*Salmo salar*) (Humphrey *et al.*, 1987).

Gli episodi di micobatteriosi nei pesci sono imputabili a più specie di micobatteri. I più frequentemente isolati sono: *M. marinum*, *M. fortuitum* e *M. chelonae* (Noga, 1996; Bruno *et al.*, 1998) sebbene ne siano segnalati anche altri come *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).

La patologia può passare per lungo tempo inosservata in quanto paucisintomatica. I casi conclamati sono caratterizzati da una letargia, esoftalmo bilaterale, lepidortosi, distensione addominale, respirazione accelerata, nuoto incoordinato, deformità scheletriche, emorragie e necrosi viscerali e cutanee, tumefazioni ed ulcerazioni cutanee. La mortalità è tipicamente a stilloidico (Roberts, 1990; Prearo *et al.*, 2002). Nei pesci le lesioni anatomopatologiche sono caratterizzate dalla comparsa di granulomi di varie dimensioni. L'aspetto è quello di noduli grigiastri con localizzazione prevalentemente epatica, splenica e renale (Noga, 1996; Prearo *et al.*, 2002).

La diagnosi differenziale si pone tra le patologie in grado di determinare lesioni nodulari. Tra le forme batteriche ricordiamo l'infezione da *Renibacterium salmoninarum* (Lorenzen *et al.*, 1997; McKibben & Pascho, 1999), da *Carnobacterium piscicola* (Noga, 1996), da *Nocardia asteroides* (Wang *et al.*, 2005). L'infezione micotica più diffusa è l'ittiofonosi, sostenuta da *Ichthyophonus* spp. (Athanasopoulou, 1992); più raramente si possono evidenziare altri miceti (*Exophiala salmonis*, *Phoma* sp., *Phialophora* sp., *Dermocystidium* sp.), (Bruno & Poppe, 1998). Tra le patologie di origine parassitaria, di notevole importanza riveste l'infezione da *Tetracapsuloides bryosalmonae*, agente eziologico della Malattia Proliferativa Renale (PKD) (Hedrick *et al.*, 1993; Canning *et al.*, 1999); più raramente sono coinvolti altri protozoi mixosporidi o microsporidi (Noga, 1996). Ricordiamo infine le cisti renali congenite, la nefrocalinosi, le forme tumorali primitive (nefroblastoma) o metastatiche (epatoma da aflatoxine) e la granulomatosi idiopatica tra le forme ad eziologia non infettiva (Landolt, 1975; Ghittino, 1985).

In Italia, le segnalazioni inerenti l'infezione da micobatteri riguardano soprattutto i pesci ornamentali (Florio *et al.*, 2003; Prearo *et al.*, 2004) ed il branzino d'allevamento (*Dicentrarchus labrax*) (Agnetti *et al.*, 2005).

Nell'episodio riportato, viene descritto un focolaio di micobatteriosi ittica da *Mycobacterium marinum* in riproduttori di trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*) e trota fario (*Salmo trutta*) allevati intensivamente in un impianto di acquacoltura del Nord Italia.

MATERIALI E METODI

In un piccolo impianto d'acquacoltura di fondo valle del Nord Italia, alimentato con acqua di risorgiva in cui venivano allevati intensivamente dei riproduttori di trota iridea e fario, veniva segnalata una mortalità a stilloidico che perdurava da diversi mesi. La patologia era

in generale paucisintomatica. I rari casi conclamati erano caratterizzati da dimagrimento, discromia (melanosi o sbiadimento della livrea), desquamazioni e ulcere cutanee (Foto 1).

Sono pervenuti al laboratorio di analisi 30 esemplari (20 trote iridee e 10 trote fario del peso variabile da 1 a 4 kg) che sono stati sottoposti ad esami di natura anatomopatologica, parassitologica, batteriologica, micologica, virologica ed istologica.



Foto 1 - Ulcerazioni cutanee in trota fario.
Photo1 - Skin ulcerations in brown trout.

Esame anatomopatologico

E' stato valutato l'aspetto esteriore cutaneo e branchiale, nonché dei visceri interni di tutti gli esemplari pervenuti al laboratorio d'analisi, al fine di poter riscontrare lesioni macroscopiche.

Esame microscopico

Con il materiale patologico proveniente da rene o fegato è stato allestito uno striscio su vetrino, successivamente fissato al calore. Sul campione così ottenuto si è eseguita la colorazione di Ziehl-Neelsen e di Gram, secondo le procedure classiche. L'osservazione del vetrino è stata effettuata al microscopio ottico con obiettivo ad immersione (100x).

Esame parassitologico

E' stato eseguito a fresco su impronta e striscio d'organo (cute, branchie e intestino), nonché con colorazione (Blu di metilene al 5% per 30") ed osservazione al microscopio ottico (ingrandimenti progressivi: 10x, 25x, 40x per i preparati a fresco; 100x per i preparati colorati).

Esame batteriologico routinario

Il tessuto renale, epatico, splenico e cerebrale è stato prelevato sterilmente con un'ansa da batteriologia da 1 µl, è stato seminato per striscio su terreni solidi di primo isolamento, come Agar Sangue e TSA (Tryptone Soy Agar). L'incubazione è avvenuta a 22°C per 48 ore.

Esame batteriologico per ricerca di *Renibacterium salmoninarum*

La semina è stata effettuata da rene su KDM2, (Kidney Disease Medium 2) (Austin & Austin, 1987) ed incubazione per 21 giorni a 15°C.

Esame batteriologico per micobatteri

Ha previsto le seguenti fasi: omogeneizzazione e decontaminazione, esame colturale su terreni specifici ed infine identificazione.

Il campione (costituito da porzioni di rene, fegato e milza) viene sminuzzato con forbici sterili; successivamente si aggiungono 10 ml di soluzione fisiologica ed il tutto viene omogeneizzato con lo stomacher. Successivamente viene prelevata un'aliquota di 2 ml di omogenato a cui si aggiungono 2 ml di una soluzione di NaOH al 4%. Il tutto viene messo ad incubare in termostato a 30°C per 30 minuti. Proseguendo, si aggiungono 0,6 ml di neutralizzante (bromocresol-porpora al 6% + acido fosforico all'85%). Si centrifuga il tutto ed eliminato il surnatante si aggiunge del tampone fosfato (pH 6,8).

Il campione così preparato è pronto per la semina su terreni solidi a base d'uovo (Löwestein-Jensen e Stonebrink), selettivi per i micobatteri, come indicato nel capitolo 2.3.3 del "Manual of standards for diagnostic tests and vaccines" (O.I.E., 2000). La sospensione rimasta può venire conservata in congelatore (-18°C). L'incubazione avviene a 22°C e 37°C in aerobiosi. Periodicamente si controlla l'eventuale sviluppo di colonie sospette sui terreni solidi, il loro aspetto e l'eventuale produzione di pigmento. Su di esse poi viene effettuata la colorazione di Ziehl-Neelsen. L'esame si considera concluso con esito negativo dopo 40 giorni senza che vi sia una evidenza di crescita batterica.

Nel caso di sospetto isolamento di *Mycobacterium* sp. viene effettuata la caratterizzazione fenotipica mediante test biochimici e culturali indicati nella Tabella 1 (Metchock *et al.*, 1999; Carter & Wise, 2004).

L'indagine genetica prevede l'impiego della PCR secondo Kulski *et al.* (1995), che utilizza 3 coppie di *primers* che permettono l'amplificazione di sequenze target in grado di caratterizzare i ceppi a livello di genere (*Mycobacterium*) e a livello di specie (*M. tuberculosis* complex e *M. avium*). I prodotti PCR ottenuti vengono esaminati in gel d'agarosio al 2%.

Il campione risultato positivo alla PCR per il genere *Mycobacterium*, ma negativa a quella per *M. tuberculosis* complex e *M. avium*, viene sottoposto a sequenziazione del rRNA 16S mediante kit Microseq 500 (Applied Biosystem) (Patel *et al.*, 2000). Il prodotto PCR amplificato viene 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. In particolare si sintetizza una copia del filamento da studiare, con una reazione di polimerizzazione che si arresta in modo specifico dopo ogni base. L'arresto della sintesi si ottiene mediante aggiunta alla reazione di polimerizzazione di 4 ddNTPs, analoghi sintetici dei dNTPs. Avvenuta la PCR, l'amplificato viene purificato mediante Dyex Spin Protocol for dye terminator removal (Qiagen), che consente di allontanare completamente i sali residui presenti. La sequenziazione viene effettuata utilizzando l'apparato ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

I risultati vengono letti da un sequenziometro sotto forma di elettroferogramma, ossia come successione di basi. La sequenza ottenuta viene infine comparata con un database contenente sequenze di riferimento, arrivando così all'identificazione del ceppo.

Tutte le sequenze vengono assemblate, modificate e confrontate con quelle presenti nel database Microseq 500 (versione 1.42, 2002) che contiene 1434 sequenze di cui 82 relative a specie di micobatteri, oppure con quelle presenti nella gene bank BLAST.

Una percentuale di divergenza compresa tra lo 0% e l'1% tra le sequenze analizzate e quelle di riferimento, indica identità tra le specie. Se la percentuale di divergenza è maggiore dell'1% la sequenza in esame è da considerarsi come "strettamente correlata" alla specie del microrganismo indicato per primo dal database.

Esame istologico

I campioni di organo (fegato, rene, milza, cute, branchie) sono stati fissati in formalina tamponata al 10%, disidratati ed inclusi in paraffina secondo le comuni metodiche istologiche.

Sezioni seriate al microtomo di 3 µm sono state colorate con Ematossilina-Eosina e con metodica di Ziehl-Neelsen per evidenziare l'eventuale presenza di batteri alcool-acido resistenti.

Esame micologico

E' stato effettuato tramite esame microscopico a fresco mediante l'allestimento di vetrini per apposizione e striscio d'organo e successiva osservazione al microscopico ottico (ingrandimenti progressivi: 10x, 25x, 40x), nonché tramite esame colturale su terreno agarizzato e brodo di Sabouraud, incubato a 22°C per 5 giorni.

Esame virologico

Per tale esame i reni dei pesci sono stati prelevati sterilmente e sottoposti ad omogeneizzazione. Il surnatante ottenuto è stato quindi inoculato in monostrati di linee cellulari recettive, come le RTG-2 e BF-2 fatte crescere in MEM addizionato con il 10% di siero fetale bovino. I monostrati sono stati osservati ogni giorno al microscopio ottico per l'eventuale individuazione di effetto citopatico. L'esame ha previsto due subcolture della durata di una settimana ciascuna.

RISULTATI

Esame anatomopatologico

I soggetti esaminati colpiti hanno mostrato uno stato di dimagrimento, emaciazione e presenza di piccole ulcere cutanee localizzate prevalentemente a livello della testa.

All'apertura della cavità addominale, si è evidenziata la presenza di noduli bianco-grigiastri di consistenza e aspetto lardaceo, delle dimensioni variabili da due millimetri a mezzo centimetro, coinvolgenti il fegato, la milza ed il rene (Foto 2 e 3). In alcuni soggetti erano visibili anche a livello branchiale piccole neoformazioni biancastre allungate a livello di lamelle branchiali secondarie (Foto 4). Tale quadro anatomopatologico era rilevabile in circa il 30% degli animali esaminati, sia tra le trote iridee, sia tra le fario, senza che tra le due specie si potesse osservare alcuna differenza anatomopatologica di rilievo.

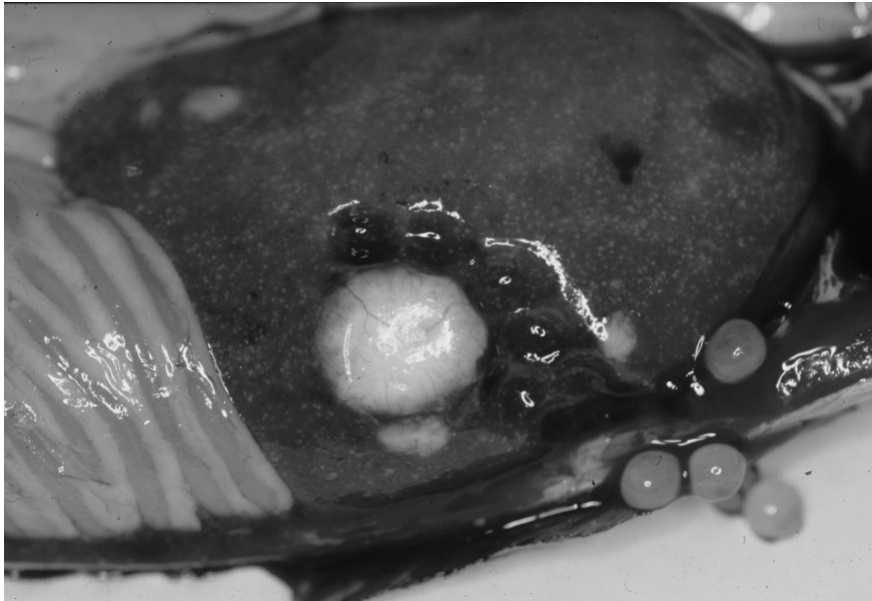


Foto 2 - Lesioni granulomatose epatiche in trota iridea.
Photo 2 - Liver granulomatous lesions in rainbow trout.

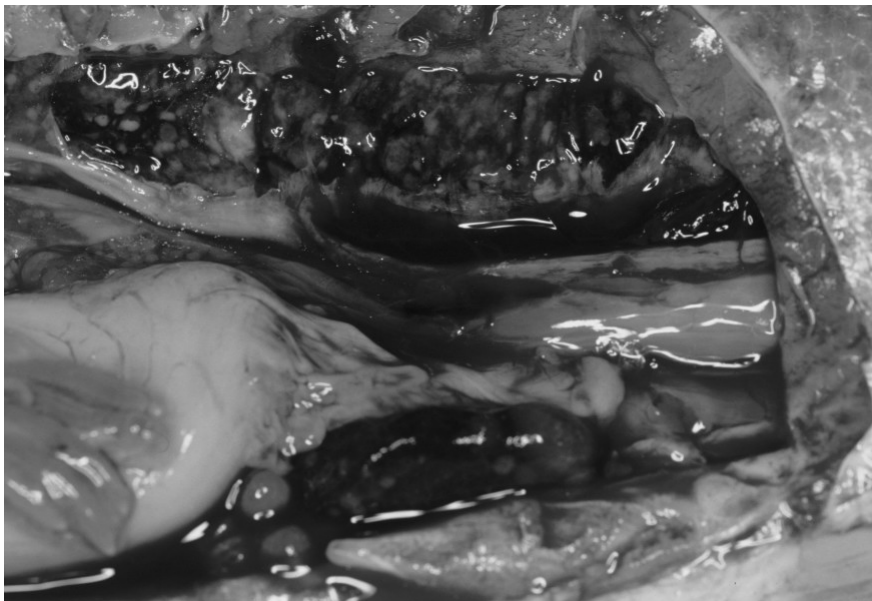


Foto 3 - Lesioni granulomatose renali in trota iridea.
Photo 3 - Kidney granulomatous lesions in rainbow trout.



Foto 4 - Lesioni granulomatose branchiali in trota iridea.
Photo 4 - Gills granulomatous lesions in rainbow trout.

Esame microscopico

Negli organi con lesioni nodulari si è evidenziata la presenza di numerosi bacilli alcool-acido resistenti.

Esame colturale per micobatteri

Ha permesso l'isolamento di colonie caratterizzate da colorazione giallo-arancione e da dimensioni massime di circa due millimetri, con aspetto lievemente rugoso. La crescita si è resa pienamente evidente dopo 14 giorni di incubazione a 22°C. La caratterizzazione fenotipica (Tabella 1) e genetica (sequenziamento rRNA 16S) del ceppo isolato ha permesso l'identificazione univoca come *Mycobacterium marinum*.

Esame istologico

Ha evidenziato in tutti gli organi analizzati (fegato, milza, rene e branchie) la presenza di numerosi granulomi caratterizzati da centro necrotico non calcificato (Foto 5), dove è stato possibile evidenziare numerosi batteri alcool-acido resistenti.

Gli esami parassitologici, batteriologici routinari e per la ricerca di *R. salmoninarum*, micologici e virologici, hanno avuto tutti esito negativo.

Esami colturali e biochimici	<i>Mycobacterium marinum</i> (Metchock <i>et al.</i> , 1999)	<i>Mycobacterium marinum</i> isolato
Produzione di pigmento	Fotocromogeno	Pigmento arancio
Morfologia delle colonie	S/SR*	SR
Morfologia microscopica	Bacilli lunghi	Bacilli sottili, lungi 1-2 μm
Crescita a 42°C	-	-
Tempo richiesto per la crescita	Crescita lenta (>7 gg)	Lenta: 14 gg
Inibizione da Idrazide dell'acido tiofen-2-carbossilico (T2H)	+	+
Riduzione del tellurito	-/+°	-
Produzione di ureasi	+	+
Deaminazione della pirazinamide (pirazinamidasi)	+	+
Crescita su agar McConkey senza cristalvioletto	-	-
Idrolisi del Tween 80	+	+
Riduzione dei nitrati	-	-
Ariilsulfatasi (tempo richiesto)	-/+ 3 gg	-3 gg/+14 gg
Produzione di catalasi termostabile	-/+	+ (debole)

LEGENDA - * S: Colonia liscia. R/S: ruvidità intermedia. -/+°: di solito negativo.

Tabella 1 - Esami colturali e biochimici eseguiti per la tipizzazione di *Mycobacterium marinum*.
Table 1 - Cultural and biochemical exams for *Mycobacterium marinum* identification.

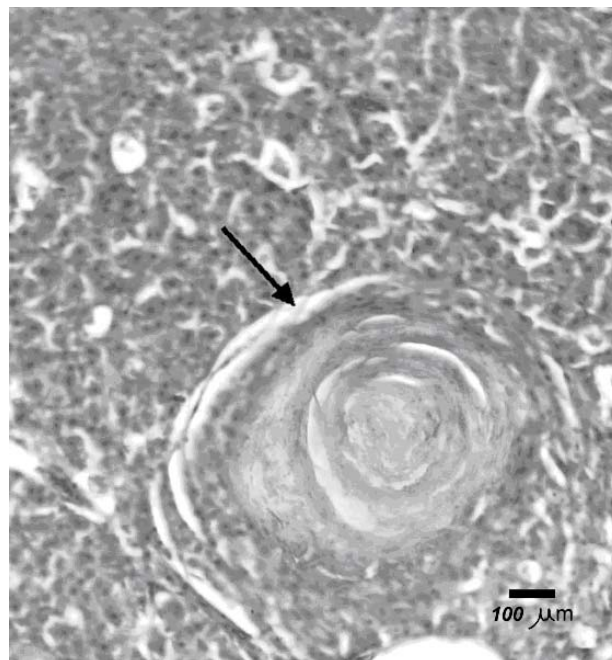


Foto 5 - Lesione granulomatosa epatica da *Mycobacterium marinum* in trota iridea (Ematossilina-Eosina).
Photo 5 - Liver granulomatous lesion due to *Mycobacterium marinum* in rainbow trout (H-E).

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Le indagini di laboratorio eseguite hanno permesso di individuare in *Mycobacterium marinum* l'agente eziologico responsabile della sintomatologia, lesioni anatomopatologiche, istologiche e mortalità riscontrate.

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

M. marinum è un agente zoonosico tra i più frequentemente isolati nell'uomo nei casi di micobatteriosi atipiche. L'infezione da micobatteri atipici è da imputarsi soprattutto alla contaminazione di ferite cutanee con acqua, materiali o pesci infetti, piuttosto che al consumo di alimenti di origine acquatica contaminati (Giavenni, 1979; Monti *et al.*, 1979; Amerio *et al.*, 1990). La lesione indotta, detta anche "granuloma da piscina" (nodulo cutaneo), è a carattere dermatologico e colpisce i frequentatori di piscine e gli operatori del settore acquaristico in caso di abrasioni o di ferite. Negli individui immunodepressi (Ristola *et al.*, 1999), oppure in quelli molto giovani (Parent *et al.*, 1995), la malattia può tuttavia generalizzare.

Considerando questi risvolti di sanità pubblica, nonché l'elevata resistenza ambientale dei micobatteri, si è optato in questo caso per la distruzione dell'intero stock ittico, conseguente vuoto sanitario con messa a secco delle vasche di stabulazione ed applicazione di opportune pratiche di disinfezione, seguendo le linee guida indicate dall'OIE (Methods for disinfection of aquaculture establishments, 2003). I prodotti utilizzati sono stati l'ossido di calcio, l'idrossido di sodio in soluzione al 2% e composti a base di cloro e fenolo.

Il trattamento così eseguito ha evitato la ricomparsa dell'infezione nell'allevamento.

BIBLIOGRAFIA

- Agnetti F., Zanoni R.G., Florio D., Latini M., Manuali E., Caffara M., Campo Dall'Orto, Ghittino C., Fioravanti M.L. & Prearo M. (2005). Segnalazione di infezione da *Mycobacterium marinum* in spigole d'allevamento. *Atti del XII Convegno Nazionale S.I.P.I., 29-30 Settembre - 1 Ottobre 2005, Cesenatico (FC), Italy*: 23.
- Amerio P., Carmenini S., De Mori F. & Santone R. (1990). Micobatteriosi atipica da *Mycobacterium marinum*. *Giornale Ital. Dermatol. Venereol.*, 125: 147-149.
- Arakawa C.K. & Fryer J.L. (1984). Isolation and characterization of a new subspecies of *Mycobacterium chelonae* infectious for salmonid fish. *Helgoländer Wiss Meeresunters*, 32: 329-342.
- Ashburner L.D. (1977). Mycobacteria in hatchery-confined Chinook (*Oncorhynchus tshawytscha* Walbaum) in Australia. *J. Fish Biol.*, 10: 523-528.
- Athanassopoulou F. (1992). Ichthyophonias in sea bream, *Sparus aurata* (L.), and rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), from Greece. *J. Fish Dis.*, 15: 437-441.
- Austin B. & Austin D.A. (1987). Bacterial fish pathogens: disease in farmed and wild fish. *Ellis, Horwood limited*.
- Austin B. & Austin D.A. (1993). Bacterial fish pathogens: disease in farmed and wild fish. 2nd edition. *Ellis, Horwood limited*.

- 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.
- Bruno D.W., Griffiths J., Mitchell C.G., Wood B.P., Fletcher Z.J., Drobniewski F.A. & Hastings T.S. (1998). Pathology attributed to *Mycobacterium chelonae* infection among farmed and laboratory-infected Atlantic salmon *Salmo salar*. *Dis. Aquat. Org.*, 33: 101-109.
- Bruno D.W. & Poppe T.T. (1998). A colour atlas of salmonid diseases. *Academic Press, Harcourt Brace & Co, Publishers*: 61-64.
- Canning E.U., Curry A., Feist S.W., Longshaw M. & Okamura B. (1999). *Tetracapsula bryosalmonae* n. sp. for PKX organism the cause of PKD in salmonid fish. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 19, 2: 203-206.
- Carter G.R. & Wise D.J. (2004). Essentials of veterinary bacteriology and mycology; 6th ed. *Oxford, Iowa State press*: 290 pp.
- Colorni A. (1992). A systemic mycobacteriosis in the European sea bass *Dicentrarchus labrax* cultured in Eilat (red Sea). *Isr. J. Aquacult Bamidgeh.*, 44: 75-81.
- Earp B.J., Ellis C.H. & Ordal E.J. (1953). Kidney disease in young salmon. *Washington State Dept of Fisheries, special report No 1*.
- 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.
- Ghittino P. (1985). Tecnologia e patologia in acquacoltura, vol. II Patologia. *Bono ed., Torino*: 444.
- Giavenni R. (1979). Alcuni aspetti zoonosici delle micobatteriosi di origine ittica. *Riv. It. Piscic. Ittiopat.*, 14, 4: 123-126.
- Hedrick R.P., McDowell T. & Groff J. (1987). Mycobacteriosis in cultured striped bass from California. *J. Wildl. Dis.*, 23: 391-395.
- Hedrick R., McConnel E. & de Kinkelin P. (1993). Proliferative kidney disease of salmonid fish. *Annual review Fish Dis.*: 227-290.
- Humphrey J., Lancaster C.E., Gudkovs N. & Copland J.W. (1987). The disease status of Australian salmonids: bacteria and bacterial diseases. *J. Fish Dis.*, 10: 403-410.
- Kulski K.J., Khinsoe C., Pryce T. & Christiansen K. (1995). Use of a multiple PCR to detect and identify *Mycobacterium avium* and *M. intracellulare* in blood culture fluids of AIDS patients. *J. Clin. Microbiol.*, 33: 668-674.
- Kusuda R., Kawakami K. & Kawai K. (1987). A fish-pathogenic *Mycobacterium* sp. isolated from an epizootic of cultured yellowtail. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 53: 1797-1804.
- Landolt M.L. (1975). Visceral granuloma and nephrocalcinosis in trout. In: *Ribelin, W.E., Migali G. (Eds.), The pathology of fishes. University of Wisconsin Press, Madison, WI*: 793-801.
- Lansdell W., Dixon B., Smith N. & Benjamin L. (1993). Isolation of several *Mycobacterium* species from fish. *J. Aquat. Anim. Health*, 5: 73-76.
- Lorenzen E., Olesen N.J., Korsholm H., Heuer O.E. & Evensen O. (1997). First demonstration of *Renibacterium salmoninarum* / BKD in Denmark. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 17, 3-4: 140-144.

