

Malattia Proliferativa Branchiale in pesci gatto americani (*Ictalurus punctatus*) allevati in Italia

Proliferative Gill Disease in channel catfish (Ictalurus punctatus) farmed in Italy

Federica Marcer^{1*}, Francesco Quaglio², Monica Caffara¹,
Maurizio Ferraresi³, Maria Letizia Fioravanti¹

¹ Dpt. di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale, Via Tolara di Sopra, 50 – 40064 Ozzano Emilia (BO)

² Dpt. di Scienze degli Alimenti, Università di Bologna, Via S. Giacomo, 9 – 40125 Bologna

³ A.U.S.L. Modena, Dipartimento di Prevenzione, Servizio Veterinario Ambito Territoriale Mirandola,
Via L. Smerieri, 2/3 – 41037 Mirandola (MO)

RIASSUNTO – La Malattia Proliferativa Branchiale, meglio conosciuta negli Stati Uniti come Proliferative Gill Disease (PGD) o Hamburger Gill Disease, è una patologia parassitaria del pesce gatto americano (*Ictalurus punctatus*) sostenuta da organismi Myxozoa caratterizzata da gravissime sindromi branchiali proliferative. L'agente eziologico della malattia è rappresentato da *Aurantiactinomyxon ictaluri*, stadio actinosporico del myxosporidio *Henneguya ictaluri*, che si sviluppa all'interno di oligocheti acquatici del genere *Dero* e che viene rilasciato da questi ultimi nell'acqua a temperature comprese tra 15 e 22° C. Si riportano i primi casi di Malattia Proliferativa Branchiale osservati in Italia in allevamenti di pesce gatto americano. I sintomi più frequenti erano rappresentati da anoressia, nuoto superficiale e letargico in prossimità delle sponde delle vasche ed atteggiamento dispnoico anche in presenza di elevate quantità di ossigeno disciolto. Si osservava in genere mortalità a stillicidio con perdite cumulative variabili tra 5 e 30% della popolazione in vasca. All'esame anatomico-patologico le branchie apparivano notevolmente ispessite, d'aspetto marmorizzato e ricoperte di abbondante muco. All'esame microscopico a fresco era possibile rilevare a livello branchiale la presenza di estese aree di ispessimento dei filamenti, con fusione delle lamelle secondarie, e numerose zone di rarefazione e "frattura" a livello dell'asse cartilagineo. All'esame istologico le branchie presentavano aree di congestione e diffusi fenomeni iperplastici, talvolta con totale fusione delle lamelle; nell'asse cartilagineo si evidenziavano zone di rarefazione e centri necrotici. Nello spessore dei filamenti branchiali e fra le lamelle si individuavano formazioni a grappolo rotondeggianti, del diametro massimo di 30 µm, circondate da intensi fenomeni iperplastici. In tutto il tessuto branchiale si osservavano emorragie ed infiltrazione leucocitaria. Gli autori espongono considerazioni sull'importanza della Malattia Proliferativa Branchiale quale patologia limitante l'allevamento del pesce gatto americano in Italia.

SUMMARY - *Proliferative Gill Disease (PGD) or Hamburger Gill Disease is a serious disease due to Myxozoan organisms causing high morbidity and mortality in channel catfish (Ictalurus punctatus) cultured in U.S.A. The aetiological agent of the disease is Aurantiactinomyxon ictaluri, the actinosporic stage of the myxosporic Henneguya ictaluri, developing in aquatic oligochaetes owing to the genus Dero and relapsed in the water at temperatures between 15 and 22° C. The first outbreaks of PGD in channel catfish farmed in Italy are reported. The main symptoms were anorexia, listless swimming at the surface along the edge of the pond, and dyspnoeic behaviour. A trickling mortality was generally observed, with a cumulative rate of 5-30% of the pond population. At the necropsy, the gills appeared very thickened, with a red-and-white mottled appearance and covered with abundant mucus. Microscopic examination of the gills revealed the presence of alternate pale swelled and red hemorrhagic areas. The cartilage supporting the gill filament showed notches, breaks and gaps. Histological lesions of the gills were characterized by epithelial hypertrophy and hyperplasia with fusion of lamellae, congestion, haemorrhages, leucocytic infiltrates. Degeneration and necrosis of the cartilage were evident. A number of elements similar to "cluster of grapes" and with a maximum diameter of 30 µm were located within the gill filaments or between the lamellae and surrounded by granulomatous inflammation. The importance of PGD as a pathology limiting the channel catfish production in Italy is discussed.*

Key words: Proliferative Gill Disease, PGD, Channel catfish, *Ictalurus punctatus*, Italy

* Corresponding Author: Federica Marcer c/o Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale, Sezione Malattie Infettive, Laboratorio di Ittiopatologia, Università di Bologna, Via Tolara di Sopra, 50 - 40064 Ozzano Emilia (BO). Tel. 051-2097044; Fax: 051-2097039; E-mail: fish@vet.unibo.it

INTRODUZIONE

La Malattia Proliferativa Branchiale, nota in USA come Proliferative Gill Disease (PGD) o Hamburger Gill Disease, è una grave e diffusa patologia parassitaria del pesce gatto americano (*Ictalurus punctatus*, Rafinesque). Negli Stati Uniti da oltre 10 anni la PGD è considerata, insieme a Setticemia Enterica da *Edwardsiella ictaluri*, Herpesvirosi da *Channel Catfish Herpesvirus* e Malattia Colonnare da *Flavobacterium columnare*, una delle patologie più importanti del pesce gatto americano d'allevamento, in grado di causare perdite variabili da pochi soggetti fino al 100% della popolazione colpita (Mitchell *et al.*, 1998; Bosworth *et al.*, 2003). Negli USA la PGD è stata inoltre segnalata nel persico sole (*Lepomis macrochirus*), nel persico trota (*Micropterus salmoides*) e nelle trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*) (Hoffmann *et al.*, 1992; Thiyagarajah, 1993).

La malattia si verifica generalmente quando la temperatura dell'acqua è compresa tra 15° C e 22° C, soprattutto nei bacini di recente allestimento (Burtle *et al.*, 1991; Mitchell *et al.*, 1998). I sintomi più ricorrenti sono rappresentati da inappetenza, nuoto letargico e superficiale in prossimità delle sponde del bacino d'allevamento ed atteggiamento dispoico anche in presenza di elevate quantità di ossigeno disciolto. Le lesioni predominanti sono a carico delle branchie, che si presentano enormemente ispessite, ricoperte da abbondante muco e di aspetto marmorizzato, simili a carne macinata (da qui la denominazione di "Hamburger Gill Disease").

L'eziologia e l'epizootologia della malattia sono state chiarite solo negli ultimi anni. Negli anni 80 alcuni autori attribuirono alcune sindromi proliferative branchiali osservate nel pesce gatto americano d'allevamento ad organismi Myxozoa del genere *Henneguya* (Duhamel *et al.*, 1986; Kent *et al.*, 1987), parassiti branchiali di frequente reperimento nei soggetti malati. Nel 1991 venne dimostrata la stretta associazione tra PGD e stadi actinospori del genere *Aurantiactinomyxon* contenuti in oligocheti Tubificidae presenti negli allevamenti colpiti dal fenomeno (Burtle *et al.*, 1991; Styer *et al.*, 1991; Bellerud *et al.*, 1995). Nel 2000 Pote *et al.* dimostrarono, mediante studi biomolecolari, che *Aurantiactinomyxon ictaluri*, stadio actinosporico del mixosporidio *Henneguya ictaluri*, rappresenta l'agente eziologico della PGD. Gli stessi autori indicarono nell'oligochete *Dero digitata*, molto diffuso negli ambienti d'allevamento di pesce gatto americano in USA e caratterizzato da una precoce colonizzazione dei bacini di nuova costituzione, l'ospite alternato idoneo per lo sviluppo e la liberazione degli stadi infettanti del parassita. Infine Belem & Pote (2001) hanno sperimentalmente dimostrato che la penetrazione di *Aurantiactinomyxon ictaluri* nell'ospite avviene prevalentemente per via branchiale, transcutanea e digerente, anche se lo sviluppo extrasporogonico e sporogonico del parassita (fino alla formazione delle spore di *H. ictaluri*) si realizzerebbe solo nel tessuto branchiale, dove la violenta risposta infiammatoria al parassita conduce ai gravissimi disturbi circolatori, respiratori ed osmoregolatori che caratterizzano la PGD.

Vengono qui riportate le osservazioni condotte nel corso dei primi episodi di Malattia Proliferativa Branchiale osservati in Italia in alcuni allevamenti di pesce gatto americano.

MATERIALI E METODI

Dal settembre 2000 si è avuta occasione di osservare alcuni episodi di grave malattia branchiale a carattere proliferativo in alcuni allevamenti di pesce gatto americano (*Ictalurus punctatus*) siti in provincia di Modena. Nel corso di questi episodi veniva riscontrata una mortalità a stillo che si prolungava per circa 3-4 settimane portando a tassi di mortalità cumulativa tra il 5 ed il 30% della popolazione presente in vasca. L'anamnesi clinica riferiva

di nuoto letargico in superficie, di preferenza in prossimità delle sponde del bacino, inappetenza fino ad anoressia, atteggiamento dispnoico anche in presenza di elevate quantità di ossigeno disciolto. Gli episodi morbosi venivano in genere osservati in pesci gatto americani di peso superiore a 200 grammi allevati in bacini in terra di recente allestimento e con temperature dell'acqua intorno a 20° C.

Su tutti i soggetti veniva eseguito l'esame anatomo-patologico e l'esame microscopico a fresco di cute, branchie ed organi interni. Per l'esame istologico porzioni di branchie e di altri organi sono state fissate in formalina tamponata al 10%, quindi incluse in paraffina; sezioni di 5 µm di spessore sono state colorate con Ematossilina Eosina (EE), PAS, Giemsa (G), Ziehl-Neelsen (ZN) e Tricromica di Crossmonn.

Su tutti i soggetti venivano inoltre eseguiti esami colturali per batteri mediante semine da rene e cervello su Tryptone Soy Agar (TSA) e Agar Sangue (AS) e da branchie e cute su Cytophaga Agar, successivamente incubati a 25° C.

RISULTATI

All'esame necroscopico tutti i soggetti esaminati presentavano branchie estremamente rigonfie, ricoperte da abbondante muco e d'aspetto marmorizzato (Fig. 1). Negli altri organi non si osservavano lesioni di rilievo.

L'esame microscopico a fresco metteva in evidenza, già a piccolo ingrandimento, presenza di grave malattia branchiale con ispessimento dei filamenti, fusione delle lamelle, diffuse aree emorragiche alternate a zone di colore biancastro, presenza di punti di rarefazione o frattura ("*breaks*", considerati dagli autori statunitensi patognomnici in corso di PGD) lungo l'asse cartilagineo di alcuni filamenti branchiali (Fig. 2).

L'esame colturale per batteri ha dato sempre esito negativo.

All'esame istologico si osservava a livello branchiale congestione ed ispessimento dei filamenti con necrosi della cartilagine (Fig. 3), diffusa ipertrofia delle cellule mucipare ed iperplasia dell'epitelio delle lamelle che, in taluni tratti, apparivano totalmente fuse fra loro (Fig. 4). Si rilevava inoltre diffusa presenza di emorragie ed infiltrazione leucocitaria, accentuatamente nello stroma delle lamelle.

Nello stroma del filamento, in prevalenza a ridosso delle strutture cartilaginee e, in minor misura, fra le lamelle vi erano corpuscoli sferici basofili, riuniti in strutture "a grappolo" (Figg. 5, 6 e 7), del diametro massimo di circa 30 µm, cinti da una reazione flogistica con presenza di macrofagi, tra cui alcuni di aspetto epitelioidi. Dove l'infiammazione pericondriale era più intensa la cartilagine appariva sofferente, deformata nella struttura, con centri di necrosi, fratture ed iperplasia ed ipertrofia dei condrociti. Le strutture "a grappolo" composte da elementi basofili erano riconducibili per conformazione e dimensioni ai "*PGD organisms*" descritti in corso di Malattia Proliferativa Branchiale, corrispondenti a stadi evolutivi (plasmodi polisporoblastici) di Myxozoa.

La sintomatologia, il quadro anatomopatologico e le lesioni istologiche, unitamente al reperimento di elementi riferibili a stadi evolutivi di Myxozoa nel tessuto branchiale, hanno permesso di emettere una diagnosi di Malattia Proliferativa Branchiale.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Benché in Italia l'allevamento intensivo del pesce gatto americano sia stato avviato da oltre dieci anni negli ambienti d'acqua dolce calda, dove la produzione di pesce gatto "nostrano"

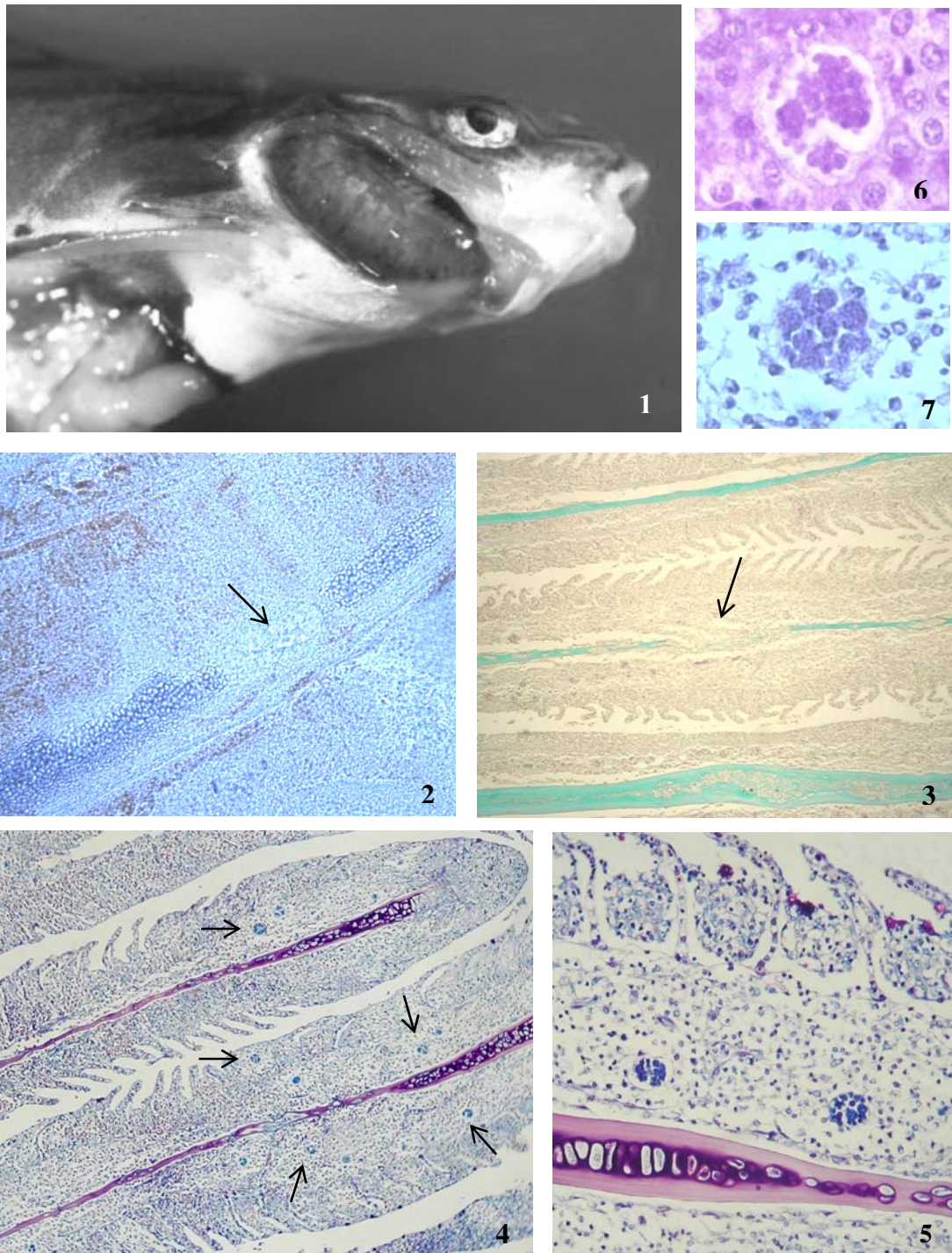


Tavola 1

Didascalie Tavola 1 –

Figura 1: Pesce gatto americano (*Ictalurus punctatus*) con Malattia Proliferativa Branchiale: le branchie si presentano notevolmente ispessite e d'aspetto marmorizzato.

Figura 2: Immagine al microscopio ottico di preparato a fresco di filamento branchiale in cui si evidenzia una caratteristica rottura ("break") dell'asse cartilagineo (freccia).

Figura 3: Sezione istologica di branchie: ispessimento del filamento branchiale con necrosi dell'asse cartilagineo (freccia) (Tricromica di Crossmonn).

Figura 4: Sezione istologica di branchie: grave infiammazione granulomatosa dei filamenti branchiali, ipertrofia ed iperplasia dell'epitelio con fusione delle lamelle. Numerosi *PGD organisms*, riferibili a stadi evolutivi di organismi Myxozoa (freccie), associati a reazioni granulomatose pericondriali (Giemsa).

Figura 5: Sezione istologica di branchie: particolare di due *PGD organisms* in filamento branchiale iperplastico, con diffusa presenza di granulociti neutrofili e macrofagi (Giemsa).

Figura 6 e 7: *PGD organisms*, riferibili a stadi evolutivi di organismi Myxozoa, in sezione istologica di branchie (fig. 6: PAS; fig. 7: Giemsa).

Figure 1: PGD in channel catfish (Ictalurus punctatus): the gills are swollen and mottled red and white in appearance.

Figure 2: Light micrograph of a fresh preparation of gill filament showing a typical "break" in the cartilage (arrow).

Figure 3: Histological section of gills: thickening of gill filaments with necrosis of cartilage (Crossmonn's Trichromic Stain).

Figure 4: Histological section of gills: severe granulomatous inflammation of gill filaments, hypertrophy and hyperplasia of epithelium with fusion of lamellae. Numerous PGD organisms referable to Myxozoan stages (arrows), associated with intense perichondrial granulomatous inflammation (Giemsa).

Figure 5: Histological section of gills: particular of two PGD organisms in hyperplastic gill filament, with diffuse presence of neutrophil granulocytes and macrophages (Giemsa).

Figure 6 & 7: PGD organisms referable to Myxozoan stages in histological sections of gills (fig. 6: PAS; fig. 7: Giemsa).

(*I. melas*) era stata fortemente limitata da patologie di origine virale, a tutt'oggi la Malattia Proliferativa Branchiale non risultava ancora descritta sul territorio nazionale.

Gli episodi da noi osservati a partire dal 2000 hanno presentato molte caratteristiche comuni a quelli descritti da altri autori negli USA (Duhamel *et al.*, 1986; MacMillan *et al.*, 1989; Burtle *et al.*, 1991; Mitchell *et al.*, 1998), ad eccezione dell'andamento della mortalità che nel nostro caso è sempre stato a stillo e di entità modesta se comparata alle perdite di oltre il 50% descritte in letteratura. Ciò potrebbe essere messo in relazione al fatto che l'andamento della malattia e la sua gravità appaiono strettamente correlati alla quantità degli oligocheti infetti presenti in vasca, al tasso d'infezione, alla densità della biomassa ed alla concomitanza di fattori stressanti (Bellerud *et al.*, 1995).

Va comunque evidenziato come non sia stato possibile raggiungere una identificazione a livello di specie dell'agente eziologico degli episodi da noi osservati, riferibile genericamente a stadi evolutivi di organismi Myxozoa. Va inoltre precisato che nei pesci gatto americani allevati in Italia non risulta descritta *Henneguya ictaluri*, responsabile di PGD negli Stati Uniti, mentre è segnalata sempre a livello branchiale *H. exilis*, (Quaglio *et al.*, 1998), che potrebbe presentare una diversa patogenicità per l'ospite.

L'applicazione di metodiche biomolecolari, quali in particolare quelle messe a punto da Whitaker *et al.* (2001), potrà aiutare a far luce sull'eziologia della PGD nel nostro Paese.

E' di tutta evidenza la necessità di stabilire la reale diffusione della PGD sul territorio nazionale, chiarendo l'identità dell'agente eziologico coinvolto, al fine di individuare idonei interventi di profilassi e controllo.

RINGRAZIAMENTI

Si ringrazia Patrizia De Matteo, del laboratorio di Istopatologia aviare ed ittica del Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale di Ozzano Emilia (BO), per l'opera prestata nell'allestimento dei preparati istologici.

BIBLIOGRAFIA

- Belem A.M.G. & Pote L.M. (2001). Portals of entry and systemic localization of Proliferative Gill Disease organisms in channel catfish *Ictalurus punctatus*. *Dis. Aquat. Org.*, 48: 37-42.
- Bellerud B.L., Pote L.M., Lin T.L., Johnson M.J. & Boyle C.R. (1995). Etiological and epizootological factors associated with outbreaks of Proliferative Gill Disease in channel catfish. *J. Aquat. Animal Health*, 7: 124-131.
- Bosworth B.G., Wise D.J., Terhune J.S. & Wolters W.R. (2003). Family and genetic group effects for resistance to proliferative gill disease in channel catfish, blue catfish and channel catfish x blue catfish backcross hybrids. *Aquaculture Res.*, 34: 569-573.
- Burtle G.J., Harrison L.R. & Styer E.L. (1991). Detection of a triactinomyxid myxozoan in an oligochaete from ponds with Proliferative Gill Disease in channel catfish. *J. Aquat. Animal Health*, 3: 281-287.
- Duhamel G.E., Kent M.L., Dybdal N.O. & Hedrick R.P. (1986). *Henneguya exilis* Kudo associated with granulomatous branchitis of channel catfish *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). *Vet. Pathol.*, 23: 354-361.
- Hoffmann R., El-Matbouli W. & Fisher-Scherl T. (1992). A proliferative gill disease (PGD) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 12: 139-141.
- Kent M.L., Duhamel G.E., Foot J.S. & Hedrick R.P. (1987). Chronic branchitis (Hamburger gill disease) of channel catfish in California and its possible myxosporean etiology. *California Fish and Game*, 73: 99-105.
- MacMillan J. R., Wilson C. & Thiyagarajah A. (1989). Experimental induction of proliferative gill disease in specific pathogen free channel catfish. *J. Aquat. Animal Health*, 1: 245-254.
- Mitchell A.J., Durborow R.M. & Crosby M.D. (1998). Proliferative gill disease (Hamburger gill disease). *SRAC Publication* n. 475.
- Pote L.M., Hanson L.A. & Shivaji R. (2000). Small subunit ribosomal RNA sequences link the cause of proliferative gill disease in channel catfish to *Henneguya* n. sp. (Myxozoa: Myxosporidia). *J. Aquat. Animal Health*, 12: 230-240.
- Quaglio F., Nobile L., Delgado M.L., Fioravanti M.L., Galuppi A., Gamberoni R., Presicce M. & Restani R. (1998). *Henneguya exilis* in pesce gatto americano *Ictalurus punctatus* (Rafinesque) allevato in Pianura Padana. *Boll. Soc. It. Patol. Ittica*, 25: 10-16.
- Styer E.L., Harrison L.R. & Burtle G.J. (1991). Experimental production of proliferative gill disease in channel catfish exposed to a myxozoan-infected oligochaete, *Dero digitata*. *J. Aquat. Animal Health*, 3: 288-291.

Thiyagarajah A. (1993). Proliferative gill disease of fish from the Tennessee-Tombigbee waterway, Mississippi. *J. Aquat. Animal Health*, 5: 219-222.

Whitaker J.W., Pote L.M., Khoo L., Shivaji R. & Hanson L.A. (2001). The use of polymerase chain reaction assay to diagnose proliferative gill disease in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *J. Vet. Diagnost. Invest.*, 13: 394-398.