

**Particolari aspetti anatomo-istopatologici in corso
di alcune micosi dei teleostei.
Considerazioni patogenetiche e note igienico-sanitarie**

*Unusual anatomo-histopathological findings in some fish
mycoses. Pathogenetic and inspective considerations*

**Fabio Marino^{1*}, Giuseppe Rapisarda¹, Giuseppe Licciardo¹,
Paola Maiolino³, Gionata De Vico¹, Francesca Conte²**

¹ Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria – Sezione di Patologia Generale e Anatomia Patologica

² Sezione di Ispezione degli Alimenti di origine Animale - Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Messina, Polo Universitario dell'Annunziata - 98168 Messina

³ Dipartimento di Patologia e sanità Animale, Università di Napoli Federico II, Via F. Delpino, 1 – 80137 Napoli

RIASSUNTO - Come per i vertebrati superiori, anche per i pesci le micosi rivestono una notevole importanza in patologia, ed il riscontro di affezioni riconducibili a proliferazioni fungine risulta sempre più frequente anche per la diffusione degli allevamenti di tipo intensivo. L'obiettivo di questo studio è contribuire alla conoscenza di inusuali aspetti anatomo-istopatologici in alcune infezioni fungine da noi osservate in esemplari di spigola (*Dicentrarchus labrax*) e di pagro (*Pagrus pagrus*), provenienti da impianti di acquacoltura, e in uno scalare (*Pterophyllum scalare*), proveniente da un acquario privato. Nel caso delle spigole e dei pagri, le osservazioni anatomo-istopatologiche ci consentivano di diagnosticare altrettante infezioni micotiche a distribuzione sistemica e a differente patogenesi: da immunodepressione per le spigole, da "iperergia" del sistema immunitario per i pagri. Nello scalare, l'esame istopatologico rivelava una derivazione dermica della neoformazione, che appariva costituita da tessuto connettivo lasso scarsamente cellulare nel cui contesto era possibile evidenziare foci di metaplasia ossea formanti trabecole disposte in maniera disordinata. Nella porzione più profonda della massa, si evidenziava una piccola cavità all'interno della quale erano visibili alcune ife fungine, fortemente PAS positive, frammiste a detriti necrotici. In conclusione gli autori discutono della possibile patogenesi delle lesioni osservate.

*SUMMARY - In this study the authors describe some mycotic infections with unusual anatomo-histopathological features in 15 sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and 8 red porgy (*Pagrus pagrus*), coming from commercial sea farms, and in an angel fish (*Pterophyllum scalare*), retrieved from a private aquarium. In the sea bass, histopathology revealed the visceral spreading of fungi (*Saprolegniaceae*), detected also within the blood vessels. Examined Red Porgies showed a single, grey, firm mass, involving almost entirely the viscera. The kidney was also involved by, white-greyish nodules of different size. Istologically, both coelomic and kidney changes appeared as granulomatous lesions characterized by a peripheric fibroblastic proliferation and mononucleated cells infiltration, and a central necrotic area, in which several thin, brownish, elongated structures were seen. These structures were strongly PAS positive and were identified as fungal hyphae. The angel fish has been sent by the owner with the request of an histopathological exam of a sexile, grey-white, slightly rough neoformation localized on the right peribuccal side. On the cut surface, the mass was dry and homogeneous in shape and colour. Histologically the dermal origin of the neoformation was demonstrated; the mass was characterized by a mixoid connective tissue almost acellular with spread islets of osseous metaplasia forming trabecules. Also neoformed bone tissue appeared acellular. In the deepest part of the mass, close to the insertion on the jaw, a cavity containing fungal hyphae and necrotic debris was observed. In conclusion, authors discuss about the of pathogenesis of observed lesions .*

Key words: Mycosis, Fish, Pseudotumors

* Corresponding Author: c/o Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria – Sezione di Patologia Generale e Anatomia Patologica Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Messina, Polo Universitario dell'Annunziata – Viale S.S. Annunziata, 98168 Messina; Tel. 090-355041; Fax 090-355660; E-mail fmario@virgilio.it

INTRODUZIONE

Come per i vertebrati superiori, anche per i pesci le micosi rivestono una notevole importanza in patologia (Tampieri, 1998) e la descrizione di affezioni riconducibili a miceti, risulta sempre più frequente anche per la diffusione di allevamenti di tipo intensivo.

Solitamente i quadri descritti riguardano le infezioni fungine a carattere epidemico, quali saprolegniosi e ittiofoniasi, soprattutto in relazione al considerevole impatto sull'economia degli allevamenti.

Più raramente, sono stati riportati anche casi di micosi da lieviti (*Candida* spp) in teleostei marini selvatici, con quadri anatomo-istopatologici riferibili a ulcere epidermiche e granulomi dermici (Macrì *et al.*, 1984). Biavati & Manera (1992) hanno comunque sottolineato le difficoltà diagnostiche istopatologiche soprattutto nelle micosi profonde, per l'impossibilità di evidenziare ed identificare, nella maggior parte dei casi, i miceti responsabili.

L'obiettivo del presente studio è di contribuire alla conoscenza di alcune infezioni fungine atipiche dei teleostei, descrivendone gli aspetti anatomo-istopatologici osservati in corso di infezione spontanea in alcune specie allevate e in un soggetto d'acquario.

MATERIALI E METODI

15 esemplari di spigola (*Dicentrarchus labrax*), 8 esemplari pagro (*Pagrus pagrus*) ed uno scalare (*Pterophyllum scalare*) venivano inviati alla Sezione di Patologia della Facoltà di Medicina Veterinaria di Messina, per indagini anatomo-istopatologiche.

Le spigole provenivano da un impianto sperimentale, in iposalinità, a ciclo chiuso in montagna. I soggetti esaminati presentava proliferazioni cotonose biancastre su varie porzioni del corpo. L'osservazione stereoscopica di dette proliferazioni, nonché l'esame istopatologico, venivano effettuati su organi e tessuti prelevati da soggetti malati ma ancora in vita.

I pagri appartenevano ad uno stock ospitato in una vasca in-shore in cemento con acqua di mare nella quale, da circa un mese, si registravano continui decessi di pesci che presentavano rigonfiamento a botte dell'addome e difficoltà natatorie. La mortalità si aggirava intorno al 6% dei soggetti ospitati nelle vasche.

Lo scalare era stato inviato dal proprietario con la richiesta di effettuare un esame istopatologico su una massa neoformata localizzata alla regione peribuccale.

Gli esemplari venivano sottoposti ad esame necroscopico e, per l'esame istopatologico, campioni di tessuti venivano fissati in formalina tamponata al 10% e inclusi in paraffina. Sezioni istologiche dello spessore di 5 µm erano quindi colorate con Ematossilina-Eosina, PAS e Tricromica di Masson.

RISULTATI

Nelle 15 spigole, l'osservazione stereoscopica e microscopica delle proliferazioni cotonose cutanee, ci consentiva di identificarle come colonie riferibili a Saprolegniaceae attecchite in aree con evidenti lesioni erosive (Figg. 1-2); l'esame istopatologico dei soggetti colpiti, consentiva inoltre di documentare la diffusione delle ife anche ad organi della cavità addominale: pancreas, intestino e milza, in cui determinavano gravi lesioni degenerativo-necrotiche e all'interno dei vasi sanguigni. La reazione infiammatoria tissutale era scarsa, tuttavia, quando l'infezione era intravascolare era possibile evidenziare ammassi di cellule

infiammatorie mononucleate disposte “a cappuccio” sulle ife fungine, probabilmente quale espressione dell’attivazione di residui meccanismi di difesa dell’ospite.



Foto 1: *Dicentrarchus labrax*: proliferazione cotonosa di colore biancastro localizzata in prossimità della pinna dorsale.

Photo 1: Dicentrarchus labrax: Saprolegniaceae infection on the cutis



Foto 2: *Dicentrarchus labrax*: preparato a fresco che mette in evidenza a forte ingrandimento ife e zoosporangi riferibili alla famiglia *Saprolegniaceae*.

Photo 2: Dicentrarchus labrax: high magnification of fungal hyphae and zoosporangia.

All'esame necroscopico, i pagri mostravano ritardo di crescita rispetto ai soggetti sani presenti nella stessa vasca, addome rigonfio e, in alcuni casi, esoftalmo e lesioni erosive cutanee. All'apertura, la cavità addominale appariva occupata da una o più masse di grandezza variabile, di consistenza compatta e di colorito grigiastro, che inglobavano gran parte dei visceri (Fig. 3). In un caso il rene appariva coinvolto da lesioni nodulari di dimensioni variabili da 1 a 5 mm, di colorito bianco-grigiastro, che interessavano il parenchima a tutto spessore, determinandone anche la deformazione del profilo.

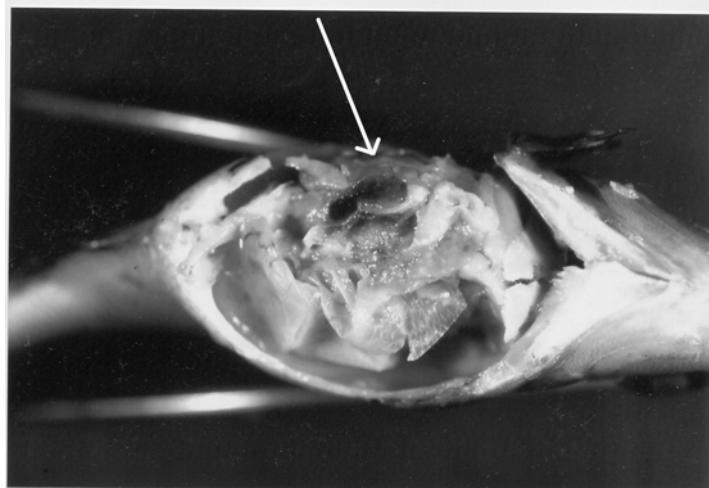


Foto 3: *Pagrus pagrus*: cavità celomatica in sezione, all'interno della quale si nota una massa unica della grandezza di una noce che ingloba gran parte dei visceri.
 Photo 3: *Pagrus pagrus*: abdominal mass involving all cavity organs.

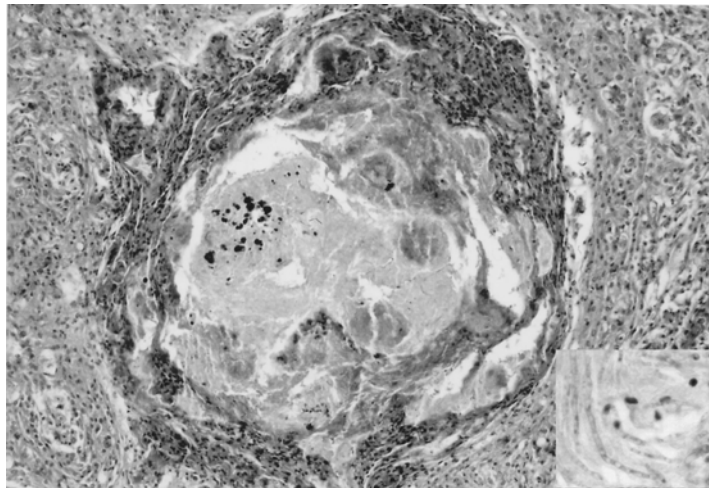


Foto 4: *Pagrus pagrus*: sezione istologica della massa addominale, in evidenza la presenza di un granuloma micotico, costituito da una zona periferica, caratterizzata da proliferazioni fibroblastiche ed infiltrazione di cellule epitelioidi, e un centro necrotico dove si repertavano numerose ife fungine (inserto: ife nel centro necrotico di un granuloma - 40x). E.E. 20x.
 Photo 4: *Pagrus pagrus*: Histological appearance of the mycotic granulom

Istologicamente, sia le masse addominali, che le lesioni nodulari del rene del pagro, apparivano quali lesioni granulomatose, costituite perifericamente da una zona di intensa proliferazione di fibroblasti e di cellule epitelioidi e da una zona centrale, necrotica, nel cui contesto erano visibili numerose strutture filiformi, brunastre e settate, PAS positive, identificabili come ife fungine (Fig. 4).

Lo scalare, in marcata cachessia, presentava una neoformazione di dimensioni 0,5 x 0,5 centimetri., pedunculata, con aspetto a cavolfiore, di colorito uniforme grigio-biancastro e di consistenza soda, a superficie lievemente rugosa, localizzata nella regione peribuccale destra (Fig. 5). Asportando la mandibola, si poteva meglio osservare come la neoformazione avesse una piccola base d'impianto sulla stessa e non interessasse il mascellare. In sezione di taglio la massa appariva di aspetto lardaceo, omogenea, asciutta e leggermente stridente al taglio.

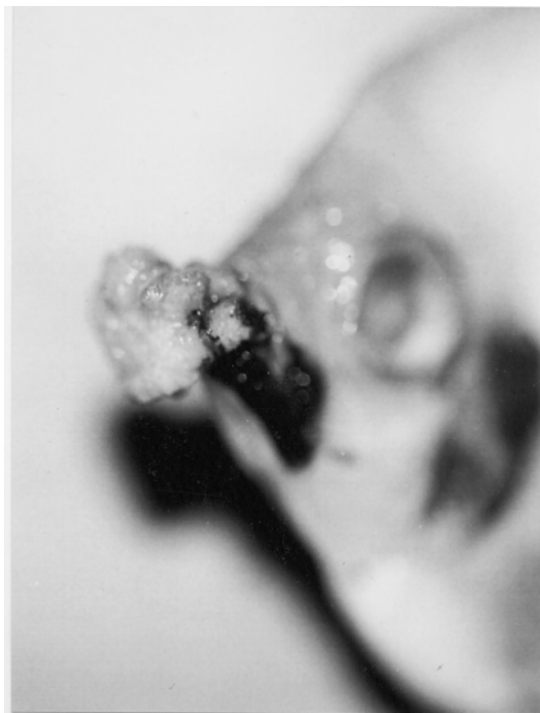


Foto 5: *Pterophyllum scalare*: massa neoformata localizzata alla regione peribuccale destra di dimensioni 0,5 x 0,5 cm, tondeggianti, pedunculata, di colorito grigio-biancastro.

Photo 5: Pterophyllum scalare: neoplastic-like buccal mass.

L'esame istopatologico rivelava una derivazione dermica della neoformazione, senza alcun interessamento dello strato epidermico sovrastante, il cui unico quadro lesivo era rappresentato da una modica iperplasia mucosa. La massa appariva costituita da tessuto connettivo lasso scarsamente cellulare nel cui contesto era possibile evidenziare foci di metaplasia ossea formanti trabecole disposte in maniera disordinata. Nella porzione più profonda della massa, in prossimità del punto d'impianto sulla mandibola, si evidenziava una piccola cavità all'interno della quale erano visibili alcune ife fungine, fortemente PAS positive, frammiste a detriti necrotici (Fig. 6).

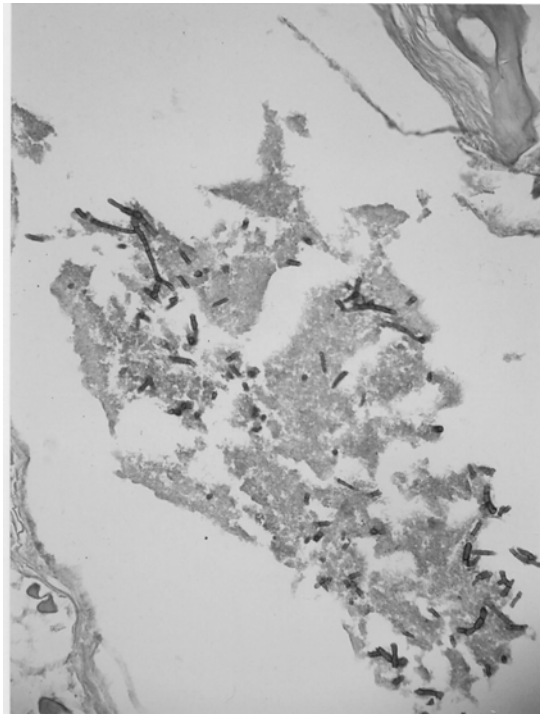


Foto 6: *Pterophyllum scalare*: sezione istologica mostrante la porzione più profonda della massa. All'interno di una cavità erano presenti si documentavano ife fungine frammiste a detriti necrotici. E.E. 40x.

Photo 6: *Pterophyllum scalare*: *Histologic appearance of the buccal mass. 40x HE.*

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Lo studio delle micosi nei pesci riveste notevole interesse scientifico per i molteplici risvolti in patologia comparata e per le eventuali ripercussioni sulle condizioni igienico-sanitarie dei soggetti colpiti.

In generale, va ricordato che nei pesci il carattere sistemico nelle infezioni fungine non è un fatto usuale se si esclude l'ittiofoniasi e, quando presente, può dipendere dall'incapacità dell'ospite di promuovere una risposta immunitaria efficiente.

Nel caso delle spigole oggetto del nostro studio, vogliamo sottolineare come, allo stato delle nostre conoscenze, lesioni simili non risultino precedentemente segnalate in letteratura. Nei soggetti studiati, lo stato di immuno-depressione, per altro suggerito dalla scarsa reazione infiammatoria tessutale nei confronti della colonizzazione da parte di *Saprolegnia* (Alvarez *et al.*, 1995), può essere dovuto sia alle non idonee condizioni d'allevamento capaci di indurre stress (sebbene non siamo riusciti a venire in possesso degli esami fisico-chimici dell'acqua, l'iposalinità doveva essere estremamente spinta, dato che ha consentito lo sviluppo di Saprolegniaceae), sia al ceppo di patogeno coinvolto nella lesione. A tale riguardo è noto che lo stress può indurre immuno-depressione grazie all'incremento dei livelli ematici di corticosteroidi cui consegue deplezione linfocitaria (Alvarez *et al.*, 1995). E' stato inoltre dimostrato che, almeno alcune Saprolegniaceae, sono capaci di produrre sostanze ad attività citotossica per le cellule degli organi linfoidi (Bly & Clem, 1992).

Tuttavia, se per le lesioni osservate nelle spigole, la patogenesi può verosimilmente essere ascritta a condizioni di “ipoergia” del sistema immunitario, i micetomi descritti nei pagri dovrebbero essere considerati come espressione di una risposta “iperergica”. Questa nostra opinione è in accordo con quanto ipotizzato da Biavati & Manera (1992) in relazione a micetomi renali osservati in orate giapponesi (*Pagrus major*) e stimola l’approfondimento degli studi in relazione alla comprensione delle dinamiche cellulari e molecolari che hanno determinato la formazione delle lesioni descritte. Va tuttavia ricordato che nei pesci sembrano esistere meccanismi di ipersensibilità ritardata per molti aspetti simili a quelli esistenti nei mammiferi; tali meccanismi potrebbero essere chiamati in causa nella patogenesi delle lesioni granulomatose osservate.

Per quanto attiene le lesioni descritte nello scalare, lo stato cachettico potrebbe verosimilmente essere la conseguenza di difficoltà nell’assunzione dell’alimento per impedimento meccanico, data la localizzazione della neoformazione. Le nostre osservazioni istopatologiche inoltre, hanno permesso di evidenziare una risposta reattiva, non infiammatoria e non neoplastica in associazione alla presenza di ife fungine, che ha generato una massa spazio occupante; questi aspetti, per quanto inusuali, potrebbero, secondo noi, consentire di ascrivere la lesione osservata nel novero di quelle definite genericamente “pseudotumori” nei vertebrati superiori. Harshbarger (1984) ne riporta diversi tipi in animali anche filogeneticamente distanti. In patologia comparata, il termine pseudotumore solido micotico è di solito utilizzato per descrivere lesioni di natura infiammatoria (Salfelder, 1990), riconducibili per lo più a miceti appartenenti ai generi *Histoplasma*, *Coccidioides* e *Cryptococcus*; meno frequentemente, a *Blastomyces* e *Paracoccidioides*; solo eccezionalmente a *Zygomycetes*, *Phaeohyphomycetes*, *Aspergillus*, *Geotrichum* e *Candida*. Il nostro caso, tuttavia, manca di aspetti infiammatori evidenti, essendo invece presenti fenomeni di ossificazione la cui patogenesi dovrà essere ulteriormente chiarita.

RINGRAZIAMENTI

Indagine effettuata con contributo del MIUR (PRIN 2001: Patologia da miceti e micotossine nei teleostei - Responsabile Scientifico Prof.ssa Francesca Conte).

BIBLIOGRAFIA

- Alvarez F., Villena A., Zapata A. & Razquin B. (1995). Histopathology of the thymus in *Saprolegnia*-infected wild brown trout, *Salmo trutta* L. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 47: 163-172.
- Biavati S. & Manera M. (1992). Micetoma renale in orata giapponese (*Pagrus major*). *Boll. Soc. It. Patol. Ittica*, 9; 1-6.
- Bly J.E. & Clem L.W. (1992). Temperature and teleost immune functions. *Fish Shellfish Immunol.*, 2: 159-171.
- Harshbarger J.C. (1984). Pseudoneoplasms in ectothermic animals. *Natl Cancer Inst Monogr*, 65: 251.
- Macrì B., Panebianco A., Costa A.L. & Midili S. (1984). Patologia da lieviti in pesci marini. Part II. Studi sull’agente eziologico, sugli aspetti anatomoistopatologici e su alcune considerazioni di ordine sanitario e ispettivo. *Summa*, 1: 89-94.
- Salfelder K. (1990). Atlas of fungal pathology – Current histopathology series consultant *Editor: Austin Gresham G. – Vol .seventeen . Kluwer Academic Publishers - Dordrecht/Boston/London.*

Tampieri M. P. (1998). Mycoses of fish. *Medical Mycology*, 36, Supplement 1: 216-219