

Caratterizzazione istologica dell'Enteromixidiosi nell'orata (*Sparus aurata*)

*Histological characterization of Enteromyxosis in gilthead seabream (*Sparus aurata*)*

**Francesco Agnetti*, Mario Latini, Elisabetta Manuali,
Carmen Panzieri, Luigi Lauro, Claudio Ghittino**

Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Via Salvemini, 1 – 06126 Perugia

RIASSUNTO - L'Enteromixidiosi è un'infezione enterica sostenuta da *Enteromyxum leei*, mixozoo responsabile di seri problemi sanitari e notevoli perdite economiche nell'allevamento di diverse specie di sparidi, tra cui l'orata. Si tratta di una tipica patologia "d'acqua calda", che coinvolge l'apparato digerente dei pesci, causando enterite necrotico-emorragica. I recenti cambiamenti climatici, uniti alle tecniche d'allevamento sempre più spinte in acquacoltura, hanno contribuito alla diffusione di questa patologia anche in Italia. Scopo del presente studio, condotto nel corso del triennio 2002-2004 mediante prelievi stagionali primaverili e autunnali, è stato quello di monitorare la diffusione della patologia nei principali impianti di maricoltura nazionali a terra e di valutare l'entità delle lesioni intestinali provocate dal parassita; nello specifico, è stata indagata la malattia da un punto di vista istologico, nell'intento di classificare le lesioni intestinali e visualizzare gli stadi parassitari. Gli esami istologici hanno infatti consentito di individuare quattro distinti gradi d'infestazione parassitaria (I, II, III, IV), a cui sono corrisposti altrettanti gradi di risposta tissutale. In tutti i pesci con sospetto clinico di Enteromixidiosi esaminati, si è notata, durante il periodo di campionamento primaverile, una prevalenza intestinale di pochi trofozoiti o di stadi parassitari poco definiti e assenza di risposta infiammatoria (grado d'infestazione I-II). Durante il campionamento autunnale, i pesci hanno invece mostrato un aumento della prevalenza di stadi parassitari ben distinti (trofozoiti, sporoblasti e spore), con presenza di quadri infiammatori piuttosto evidenti (grado d'infestazione III-IV), in accordo coi reperti anatomico-patologici e microscopici a fresco.

SUMMARY - *Enteromyxosis* is an enteric disease caused by *Enteromyxum leei*, a Myxozoan parasite responsible for serious economic losses in several cultured Sparid species, gilthead seabream in particular. It is a typical "warm water condition" inducing necrotic and hemorrhagic enteritis. Recent climate changes, along with intensive mariculture techniques, have contributed to the spreading of the disease in Italian fish farms. Aim of this study, performed during the period 2002-2004, was to investigate the lesions caused by the parasite. Histological examinations allowed to classify *E. leei* infection into four stages (I, II, III, IV), corresponding to four different grades of enteric tissue reaction. Gilthead seabream clinically suspected for the disease, collected during spring time, showed a histological feature related to stages I and II (few trophozoites or *E. leei* not clear stages, with no inflammatory reaction); on the contrary, those collected during fall time, showed more important inflammatory reaction of the enteric tissue, due to the presence of trophozoites, sporoblasts and spores of *E. leei*.

Key words: Enteromyxosis, *Enteromyxum leei*, Histological lesions.

* Corresponding author: c/o Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Centro di Acquacoltura e Ittiopatologia, Via L. A. Muratori, 4 – 05100 Terni; Tel. 0744-402476; Fax 0744-59718; E-mail: f.agnetti@izsum.it

INTRODUZIONE

L'Enteromixidiosi è un'infezione enterica sostenuta da *Enteromyxum leei* (phylum Myxozoa, classe Myxosporea, ordine Bivalvulida, sottordine Variisporina, famiglia Myxidiidae) (Kent *et al.*, 2001), parassita oggetto di studio poiché responsabile di seri problemi sanitari e notevoli perdite economiche nell'allevamento di molte specie ittiche mediterranee, tra cui in modo particolare gli sparidi e l'orata (*Sparus aurata*) (Pattono *et al.*, 1997).

Trattasi di una tipica patologia "d'acqua calda", che coinvolge l'apparato digerente dei pesci, causando enterite necrotico-emorragica (Roberts, 2001); nell'orata ha un andamento cronico, che determina progressivo dimagrimento e deperimento dell'animale e mortalità a stitlicidio, nonché un prodotto finale di qualità scadente e quindi poco idoneo al consumo.

I recenti cambiamenti climatici, uniti alle massicce importazioni di novellame e alle tecniche d'allevamento sempre più spinte, hanno contribuito alla diffusione di questa patologia anche in Italia, congiuntamente ad altre di differente natura eziologica (Ghittino *et al.*, 2003).

Come già accennato, l'orata non è la sola specie recettiva a *E. leei*; perdite elevate causate da tale parassita sono state segnalate anche in allevamenti di altri sparidi, quali l'orata giapponese (*Pagrus major*) e il sarago pizzuto (*Diplodus puntazzo*) (Diamant, 1992; Le Breton & Marques, 1995; Sakiti *et al.*, 1996), di ombrine ocellate (*Sciaenops ocellatus*) dopo coabitazione con orate infette (Diamant, 1998), nonché in cefali selvatici (*Liza aurata*, *L. ramada*, *Mugil cephalus*, *Chelon labrosus*) (Paperna, 1998). Il rombo (*Scophthalmus maximus*) è invece sensibile a *E. scophthalmi*, specie filogeneticamente correlata ad *E. leei* (Palenzuela *et al.*, 2002; Redondo *et al.*, 2002).

Il ciclo biologico di *E. leei*, come per molti Mixozoi, è stato e resta non del tutto conosciuto. Grazie alle indagini istologiche e biomolecolari è stato possibile identificare i vari stadi di *E. leei*, ma solo ipotizzare una trasmissione indiretta e/o diretta del parassita ai pesci, il che spiegherebbe l'enorme impatto della malattia negli impianti intensivi (Palenzuela *et al.*, 2004). Nell'ambito dei Mixozoi, dettagli completi sul ciclo di sviluppo sono disponibili soprattutto per *Myxobolus cerebralis* (Kent *et al.*, 2001). Anche per *E. leei* è possibile pensare ad un ciclo basato su due ospiti: il pesce e un invertebrato (presumibilmente un anellide oligocheta). Dal pesce infetto si libererebbero, attraverso le feci, spore delle dimensioni di 10-12 x 5-6 µm; tali spore potrebbero essere ingerite dall'anellide, nel cui tubo digerente andrebbero incontro ad un processo schizogonico, che porterebbe alla formazione di elementi plasmodiali (5-6 x 2-3 µm). Il pesce, ingerendo l'anellide, assumerebbe gli elementi plasmodiali; nell'intestino del pesce avverrebbe il completamento del ciclo, con penetrazione dei plasmodi nella mucosa intestinale e inizio di una fase sporogonica che, attraverso la produzione di trofozoiti e sporoblasti (stadi intermedi delle dimensioni di 20-25 x 15-20 µm) porterebbe alla formazione di nuove spore, eliminate poi con il flusso fecale. La presenza degli stadi parassitari nell'epitelio intestinale dell'orata, nonché il quadro infiammatorio che ne deriva, determinano fenomeni di enterite catarrale-emorragico-necrotica ad andamento cronico, e quindi progressivo deperimento dell'animale: i pesci risultano magri, emaciati, letargici; la mortalità può arrivare a valori medi annui di circa il 20% (Ghittino *et al.*, 2003).

Attualmente, la produzione derivante dall'allevamento di specie ittiche marine raggiunge, in Europa meridionale e nel bacino del Mediterraneo, le 160.000 tonnellate annue, di cui 95.000 sono rappresentate da orate. L'Italia, nel 2003, ha prodotto circa 8.000 t di orate: da questi dati si può comprendere come l'allevamento di questa specie sia primaria per la maricoltura italiana e quanto sia importante un monitoraggio continuo delle condizioni sanitarie degli allevamenti, per riconoscere, quantificare e ridurre i rischi della presenza di

eventuali agenti patogeni, tra cui *E. leei*, in grado di compromettere seriamente la salute dei pesci allevati.

Il presente studio, condotto nel corso del triennio 2002-2004, ha avuto lo scopo di monitorare la diffusione della patologia nei principali impianti di maricoltura nazionali a terra e di valutare l'entità delle lesioni intestinali provocate dal parassita; nello specifico, è stata indagata la malattia da un punto di vista istologico, nell'intento di classificare le lesioni intestinali e visualizzare gli stadi parassitari precoci.

MATERIALI E METODI

Per giungere ad una diagnosi di Enteromixidiosi su base istologica e per classificare le lesioni intestinali, sono stati esaminati esemplari di *Sparus aurata* allevati in impianti intensivi a terra, laddove venivano riferite notizie anamnestiche riconducibili a questa patologia.

Gli impianti monitorati (in numero di 10) dispongono di vasche in cemento con pianta rettangolare e vasche in terra ricoperte da telone plastificato con pianta circolare e profondità di circa 1,5 m. Il novellame viene introdotto nelle vasche alla taglia di circa 2-2,5 g. e viene allevato fino al raggiungimento della taglia commerciale (circa 300-400 g.) in un periodo compreso fra uno e due anni.

In ciascun allevamento sono state considerate due popolazioni di orate: una con condizioni cliniche riconducibili ad Enteromixidiosi (scarso appetito, dimagrimento, aspetto generale scadente) ed un'altra apparentemente sana, di controllo. Entrambe le popolazioni erano omogenee per data d'introduzione in vasca, alimento somministrato, trattamenti profilattici effettuati.

Da ciascuna vasca sono stati prelevati i pesci in due distinti periodi: un primo campionamento in primavera (aprile-maggio) e un secondo campionamento in autunno (settembre-ottobre). I pesci sono stati catturati manualmente, con l'impiego di reti. Ogni prelievo era costituito da 60 esemplari per vasca, di taglia variabile tra 100 e 200 g. (Tabella 1).

	Periodo	N° vasche considerate	Taglia dei pesci al momento del prelievo	N° pesci prelevati da ciascuna vasca	Totale pesci esaminati
Primo prelievo	Aprile-Maggio	2*	100-200 g	60	120
Secondo prelievo	Settembre-Ottobre	2*	100-200 g	60	120
Legenda: * una vasca contenente pesci con segni clinici riconducibili a Enteromixidiosi e una con pesci senza sintomi clinici apparenti.					

Tabella 1 - Protocollo di campionamento in ciascun impianto monitorato.
 Table 1 – Sampling protocol in each of the monitored fish farm.

Le orate sono state sacrificate con overdose di anestetico MS222, trasportate in condizioni di refrigerazione e sottoposte ad esame anatomo-patologico, parassitologico a fresco e istologico.

Gli esami autoptici sono stati eseguiti secondo metodica standard. L'esame parassitologico è stato eseguito mediante osservazione microscopica a fresco dei raschiati di mucosa intestinale.

I campioni per gli esami istologici, rappresentati da segmenti intestinali successivi, sono stati fissati in formaldeide al 4%, inclusi in paraffina e tagliati a uno spessore di 5-6 µm; la colorazione dei preparati è stata effettuata con Ematossilina-Eosina (E-E); su ogni vetrino sono state poste 4 o 5 sezioni, corrispondenti ai diversi tratti intestinali; per facilitare la lettura, ciascuna sezione è stata suddivisa in quattro quadranti (A-B-C-D) procedendo poi ad un'osservazione per quadranti alternati (A-C oppure B-D). Si è focalizzata l'attenzione sulla presenza o meno di infiltrato infiammatorio e conseguente ispessimento connettivale, di distacco epiteliale e presenza di detriti cellulari nel lume, di fenomeni di vacuolizzazione tissutale, nonché sul reperimento e conteggio dei diversi stadi del parassita (trofozoiti, sporoblasti, spore), stabilendo quattro diversi gradi di infestazione da *E. leei*, secondo quanto riportato in tabella 2.

GRADO	LESIONI E STADI PARASSITARI OSSERVATI
I	Assenza di stadi parassitari o presenza di pochi stadi parassitari non definiti; assenza di risposta infiammatoria tessutale; assenza di detriti cellulari nel lume intestinale.
II	Pochi trofozoiti e/o pochissimi sporoblasti; presenza di modico infiltrato infiammatorio, con lieve ispessimento connettivale e rare zone di epitelio distaccato; principi di vacuolizzazione.
III	Aggregati di trofozoiti e sporoblasti; presenza di poche spore; infiltrato infiammatorio abbondante, con importante ispessimento connettivale, vaste zone di epitelio distaccato e molti detriti nel lume intestinale; vaste aree di vacuolizzazione.
IV	Molti sporoblasti e spore; abbondante infiltrato infiammatorio; epitelio quasi completamente distaccato, con numerosi detriti nel lume intestinale; perdita quasi completa della struttura tessutale intestinale.
Legenda: I = normale, II = lieve, III = medio, IV = severo	

Tabella 2 - Classificazione del grado d'infestazione da *Enteromyxum leei* in base ai reperti istologici.
 Table 2 – *Enteromyxum leei* infection stage classification according to histological features.

RISULTATI

Vasche con sospetta Enteromixidiosi

Gli esemplari provenienti da queste vasche si sono presentati magri ed emaciati (Foto 1); all'esame anatomopatologico è stata notata lieve anemia branchiale e forte congestione del pacchetto intestinale (Foto 2). All'apertura del tubo digerente è stata evidenziata un'enterite catarrale-emorragica, diffusa soprattutto nell'ultimo tratto intestinale (Foto 3). L'entità di

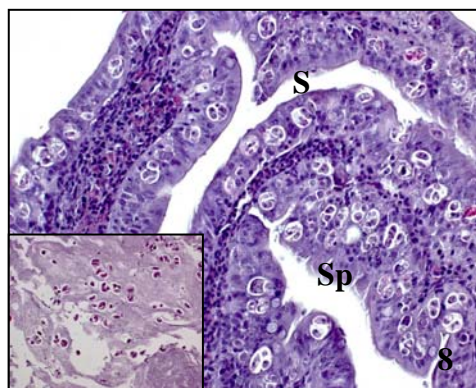
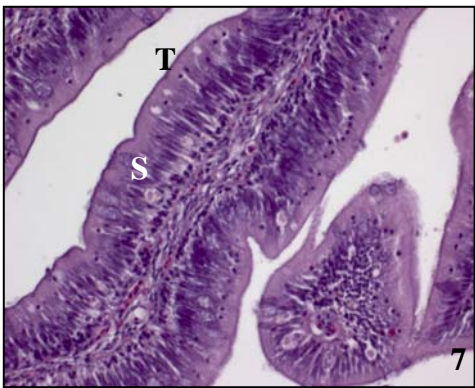
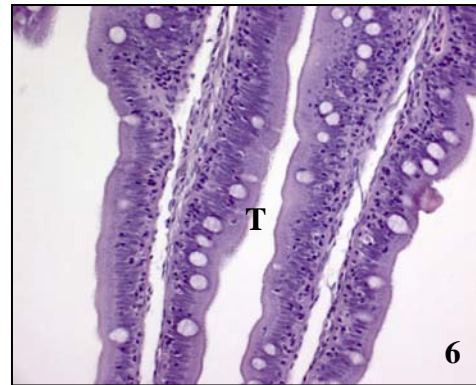
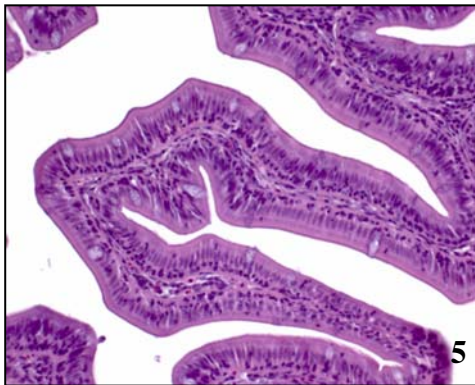
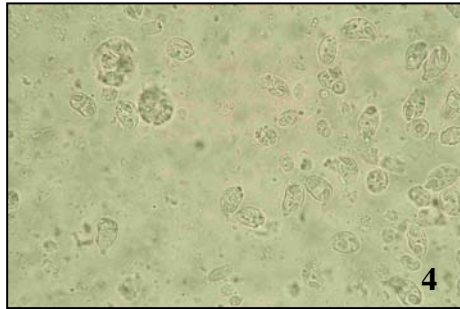


Tavola 1 - Foto 1 - Emaciazione ed evidente dimagrimento in orata affetta da Enteromixidiosi. Foto 2 - Congestione del pacchetto intestinale in orata affetta da Enteromixidiosi. Foto 3 - Enterite emorragica in orata affetta da Enteromixidiosi. Foto 4 - Esame microscopico a fresco del contenuto intestinale: spore di *Enteromyxum leei* (40 x). Foto 5 - Grado d'infezione I: assenza di stadi parassitari e di risposta infiammatoria tessutale (E-E, 20 x). Foto 6 - Grado d'infezione II: pochi trofozoiti (T); presenza di modico infiltrato infiammatorio, con lieve ispessimento connettivale (E-E, 20 x). Foto 7 - Grado d'infezione III: trofozoiti (T) e sporoblasti (S); infiltrato infiammatorio abbondante, con ispessimento connettivale (E-E, 40 x). Foto 8 - Grado d'infezione IV: molti sporoblasti (S) e spore (Sp); abbondante infiltrato infiammatorio (E-E, 40 x); epitelio quasi completamente distaccato, con numerosi detriti nel lume intestinale (riquadro).

Plate 1 - Photo 1 - Emaciation and severe starvation in gilthead seabream affected by Enteromyxosis. Photo 2 - Intestinal congestion in gilthead seabream affected by Enteromyxosis. Photo 3 - Hemorrhagic enteritis in gilthead seabream affected by Enteromyxosis. Photo 4 - Microscopic examination of faecal flow: presence of Enteromyxum leei spores (40 x). Photo 5 - Infection stage I: absence of parasites and no inflammatory reaction of the intestinal tract (H-E, 20 x). Photo 6 - Infection stage II: few trophozoites (T)(arrow); scarce inflammatory infiltrate and light connective thickening (H-E, 20 x). Photo 7 - Infection stage III: trophozoites (T) and sporoblasts (S); evident inflammatory response and connective thickening (H-E, 40 x). Photo 8 - Infection stage IV: several sporoblasts (S) and spores (Sp); great inflammatory reaction (H-E, 40 x); intestinal epithelium disruption, with presence of debris in the lumen (box).



queste lesioni è progressivamente peggiorata nel periodo intercorrente tra i due campionamenti: le orate prelevate in autunno, infatti, hanno mostrato un quadro anatomo-patologico più severo rispetto a quelle catturate in primavera.

Gli esami microscopici a fresco dei raschiati di mucosa intestinale hanno rilevato presenza di pochi sporoblasti e spore di *E. leei* nei pesci prelevati in primavera, che sono poi aumentate in quelli prelevati in autunno (Foto 4).

Gli esami istologici hanno mostrato differenti quadri infiammatori, con presenza dei diversi stadi parassitari (Foto 5, 6, 7, 8), secondo quanto riportato nelle tabelle 3 e 4.

Totale pesci prelevati in aprile-maggio	Grado infestazione I	Grado infestazione II	Grado infestazione III	Grado infestazione IV
120	80%	15%	5%	-

Tabella 3 - Esito degli esami istologici eseguiti sui campioni intestinali delle orate provenienti dalle vasche con sospetta Enteromixidiosi nel primo periodo di campionamento (valori % medi per ciascun allevamento considerato).

Table 3 - Results of histological examination on gilthead seabream intestine samples collected from suspected infected ponds, during the first sampling period (average percentage values in each fish farm considered).

Totale pesci prelevati in settembre-ottobre	Grado infestazione I	Grado infestazione II	Grado infestazione III	Grado infestazione IV
120	70%	15%	5%	10%

Tabella 4 - Esito degli esami istologici eseguiti sui campioni intestinali delle orate provenienti dalle vasche con sospetta Enteromixidiosi nel secondo periodo di campionamento (valori % medi per ciascun allevamento considerato).

Table 4 - Results of histological examination on gilthead seabream intestine samples collected from suspected infected ponds, during the second sampling period (average percentage values in each fish farm considered).

Come si evince dai dati riportati nelle tabelle 3 e 4, i gradi di infestazione I e II (pochi trofozoiti e rarissimi sporoblasti, con scarsa risposta infiammatoria) sono prevalsi nei pesci prelevati durante il periodo primaverile, mentre i gradi III e IV (abbondanti trofozoiti, sporoblasti e spore, con infiltrato infiammatorio e distacco epiteliale) sono comparsi negli animali prelevati durante il periodo autunnale, in accordo coi reperti anatomopatologici e microscopici a fresco.

Vasche di controllo

Gli esemplari provenienti da queste vasche si sono presentati in buone condizioni, con sviluppo e stato nutrizionale nella norma; all'esame anatomopatologico non sono state apprezzate particolari lesioni esterne e/o viscerali.

Gli esami microscopici a fresco dei raschiati di mucosa intestinale non hanno rilevato presenza di sporoblasti e/o spore di *E. leei*.

Gli esami istologici non hanno permesso di notare stadi parassitari nella parete o nel lume intestinale, né lesioni infiammatorie riconducibili alla loro presenza.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

I dati ottenuti durante il presente studio hanno permesso di stabilire come l'Enteromixidiosi sia ampiamente diffusa negli allevamenti considerati.

Le popolazioni di orate campionate che presentavano sintomi di questa patologia, hanno dimostrato positività istologica al parassita.

In tutti i pesci provenienti dalle vasche con sintomatologia clinica riconducibile a Enteromixidiosi si è notata istologicamente, durante il primo campionamento (aprile-maggio), una presenza intestinale di pochi trofozoiti o di stadi parassitari poco definiti e una modica risposta infiammatoria (grado d'infestazione I-II).

Durante il secondo campionamento (settembre-ottobre), i pesci hanno invece mostrato un aumento della presenza di stadi parassitari ben distinti (trofozoiti, sporoblasti e spore), con quadri infiammatori piuttosto evidenti (grado d'infestazione III-IV).

L'andamento cronico e il carattere debilitante che caratterizzano la malattia nell'orata sono responsabili di perdite medie annue che possono arrivare anche a valori del 20%; il forte impatto negli allevamenti è determinato essenzialmente dalla mancanza di presidi terapeutici efficaci, il che implica l'applicazione di misure di profilassi diretta atte a prevenirne l'ulteriore diffusione (Ghittino *et al.*, 2003).

E' perciò importante evitare di introdurre il parassita in allevamento. Ciò può realizzarsi con l'acquisto di novellame proveniente da centri di riproduzione indenni e con l'effettuazione di controlli periodici a campione, mediante l'uso di metodiche istologiche in parallelo a indagini biomolecolari (PCR) (Palenzuela *et al.*, 2004).

BIBLIOGRAFIA

Diamant A. (1992). A new pathogenic histozoic *Myxidium* (Myxosporea) in cultured gilt-head sea bream *Sparus aurata* L. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 12: 64-66.

Diamant A. (1998). Red drum *Sciaenops ocellatus* (Sciaenidae), a recent introduction to Mediterranean mariculture, is susceptible to *Myxidium leei* (Myxosporea). *Aquaculture*, 162: 33-39.

- Ghittino C., Latini M., Agnetti F., Panzieri C., Lauro L., Ciappelloni R. & Petracca G. (2003). Emerging pathologies in aquaculture: effects on production and food safety. *Vet. Res. Communicat.*, 27, Suppl. 1: 471-479.
- Kent M.L., Andree K.B., Bartholomew J.L., El-Matbouli M., Desser S.S., Devlin R.H., Feist S.W., Hedrick R.P., Hoffmann R.W., Khattra J., Hallett S.L., Lester R.J.G., Longshaw M., Palenzuela O., Siddall M.E. & Xiao C. (2001). Recent advances in our knowledge of the Myxozoa. *J. Eukar. Microbiol.*, 48, 4: 395-413.
- Le Breton A. & Marques A. (1995). Occurrence of an histozoic *Myxidium* infection in two marine cultured species: *Puntazzo puntazzo* C. and *Pagrus major*. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 15: 210-212.
- Palenzuela O., Agnetti F., Albinana G., Alvarez-Pellitero P., Athanassopoulou F., Crespo S., Diamant A., Ghittino C., Golomazou H., Le Breton A., Lipshitz A., Marques A., Padros F., Ram S. & Raymond J.C. (2004). Applicability of PCR screening for the monitoring of *Enteromyxum leei* (Myxozoa) infection in Mediterranean aquaculture: an epidemiological survey in Sparid facilities. *Int. Conf. Aquac. Europe 2004 – Biotechnologies for quality, Barcelona, October 20-23, 2004; Eur. Aquac. Soc., spec. Public.*, 34: 639-640.
- Palenzuela O., Redondo M.J. & Alvarez-Pellitero P. (2002). Description of *Enteromyxum scopthalmi* gen. nov., sp. nov. (Myxozoa), an intestinal parasite of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) using morphological and ribosomal RNA sequence data. *Parasitology*, 124: 369-379.
- Paperna I. (1998). Mariculture versus environment: risks and impacts. *Biol. Mar. Medit.*, 5, 1: 381-389.
- Pattono D., Bozzetta E., Prearo M., Rogato F., Gilmozzi M. & Ghittino C. (1997). Case of parasitic enteritis in gilthead seabream intensively cultured in Italy. *Boll. Soc. It. Patol. Ittica*, 21: 13-19.
- Redondo M.J., Palenzuela O., Riaza A., Macías A. & Alvarez-Pellitero P. (2002). Experimental transmission of *Enteromyxum scopthalmi* (Myxozoa), an enteric parasite of turbot *Scophthalmus maximus*. *J. Parasitol.*, 88, 3: 482-488.
- Roberts R.J. (2001). Fish pathology. *W. B. Sanders Edition*: 88.
- Sakiti N., Tarer V., Jacquemin D. & Marques A. (1996). Présence en Méditerranée occidentale d'une Mixosporidie histozoïque pathogène dans les élevages du daurade, *Sparus aurata*. *Ann. Sci. Nat. Zool. Paris*, 17: 123-127.