

## Descrizione di un episodio di Microsporidiosi in orate (*Sparus aurata* L.) d'allevamento

### *Occurrence of an outbreak of Microsporidiosis in farmed gilthead sea bream (Sparus aurata L.)*

Francesco Quaglio<sup>1\*</sup>, Roberto Bresolin<sup>2</sup>, Federica Marcer<sup>3</sup>,  
Monica Caffara<sup>3</sup>, Maria Letizia Fioravanti<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Scienze degli Alimenti, Università di Bologna, Via S. Giacomo, 9 - 40125 Bologna.

<sup>2</sup> Ittioconsult, Piazzale Bertesi, 4 - 41012 Carpi (MO).

<sup>3</sup> Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale, Università di Bologna, Via Tolara di Sopra, 50 - 40064 Ozzano Emilia (BO).

**RIASSUNTO** - Le infezioni da microsporidi (phylum Microspora), segnalate frequentemente nel passato in pesci delle acque libere, sono state studiate negli ultimi anni anche in relazione alla loro diffusione e patogenicità in pesci d'allevamento. Viene qui descritto un episodio di Microsporidiosi osservato in orate (*Sparus aurata* L.) allevate presso un impianto intensivo di maricoltura in Sardegna. L'episodio si è verificato in due vasche ed è stato caratterizzato da una mortalità iniziale moderata (massimo 30 soggetti/giorno) ed un'improvvisa elevata mortalità (diverse centinaia di soggetti) in concomitanza di un intervento terapeutico. I soggetti colpiti presentavano ipermelanosi, atassia natatoria e nuoto in superficie. All'esame necroscopico si riscontravano, disseminati nella muscolatura scheletrica, numerose formazioni cistiche biancastre di forma ovoidale o ellissoidale e di dimensioni variabili da 1 a 10 mm in lunghezza e da 1 a 2 mm in larghezza. All'esame microscopico a fresco queste formazioni risultavano ripiene di spore di microsporidi di forma ellittica, di misura omogenea (3,5-4 x 2-2,5 µm) e caratterizzate dalla presenza di un ampio vacuolo posteriore che occupava oltre metà del corpo. All'esame istologico le formazioni cistiche macroscopicamente rilevate risultavano composte da ammassi di microsporidi di varia estensione, limitati da una modesta infiltrazione parvicellulare. La presenza di macrofagi è stata rilevata solo in prossimità delle lesioni più avanzate. Il tessuto muscolare circostante si presentava atrofico, a tratti di aspetto ialino con sparse emorragie. L'endomisio ed il perimisio apparivano ispessiti. Gli autori ipotizzano che i microsporidi da loro riscontrati possano appartenere al genere *Kabatana* ed indicano l'opportunità di ricorrere ad esami ultrastrutturali e biomolecolari per raggiungere una conferma di genere e un'identificazione a livello di specie.

**SUMMARY** – Even if infections due to microsporidia (phylum Microspora) have been frequently described in the past from wild fish, recent studies have reported their diffusion also in farmed fish. An outbreak of Microsporidiosis in intensively cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) in Sardinia is here described. The episode occurred in two tanks and was characterized by an early mild mortality (maximum 30 dead fish/day) followed by a sudden high mortality (several hundreds of fish) in consequence of a stressing treatment operation. At the necropsy the presence of numerous whitish cysts in the trunk muscle was revealed; the cysts were ovoid or ellipsoidal in shape and measured 1-10 mm in length and 1-2 mm in width. At the microscopic exam of fresh mounts, the cysts resulted to be filled of microsporidian spores. These were ovoid in shape, with homogeneous measures (3.5-4 X 2-2.5 µm) and with a large posterior vacuole occupying more than a half part of the body. At the histological examination the cysts appeared composed of aggregates of spores, surrounded by a slight inflammatory reaction. Macrophages were only observed in presence of mature cysts. Severe regressive changes were observed in skeletal muscle tissue, with atrophy, myonecrosis and haemorrhages. The authors assume that the parasite could be referred to the genus *Kabatana* and indicate the opportunity to carry out some ultrastructural and molecular analysis to confirm the genus and identify the species.

**Key words:** Microspora, *Kabatana*, Gilthead sea bream, *Sparus aurata*, Mariculture, Italy

\* Corresponding Author: c/o Dipartimento di Scienze degli Alimenti, Via S. Giacomo, 9 - 40125 Bologna, Italia. Tel.: (+39) 051-2094228; Fax: (+39) 051-251936, E-mail: f.quaglio@alma.unibo.it

## INTRODUZIONE

Il phylum Microspora è costituito da un vasto gruppo di organismi eucarioti unicellulari descritti come parassiti endocellulari di invertebrati e vertebrati (Canning & Lom, 1986; Wittner & Weiss, 1999). L'accresciuto interesse del mondo scientifico riscontrato negli ultimi anni nei confronti di questi parassiti va correlato prevalentemente all'aumento delle infezioni da Microspora descritte nell'uomo, spesso in stretta correlazione all'instaurarsi di sindromi immunodepressive (Bell *et al.*, 2001).

Le dimensioni molto ridotte di questi parassiti (pochi micrometri) e l'assenza di caratteri utili ad una diagnosi differenziale su base morfologica hanno creato e tuttora creano notevoli difficoltà tassonomiche (Larsson, 1999). Attualmente lo studio delle caratteristiche ultrastrutturali e molecolari di questi parassiti hanno dato origine a nuove chiavi identificative facendo luce sulla tassonomia di questo phylum (Franzen & Müller, 1999; Shaw & Kent, 1999; Lom *et al.*, 2001; Lom & Nilsen, 2003).

Nelle specie ittiche i parassiti microsporidi sono in grado di provocare l'insorgenza di gravi e debilitanti malattie, caratterizzate spesso da lesioni macroscopicamente evidenti. Sindermann (1990) le ha annoverate tra le più gravi forme parassitarie che possono colpire i pesci ed altri autori le hanno reputate corresponsabili del declino degli stock di pesca in alcune aree geografiche (Haley, 1954; Dogiel *et al.*, 1958).

Il ciclo biologico dei microsporidi è diretto e la trasmissione avviene per via digerente, mediante ingestione di spore mature (Lom & Dyková, 1992). Lo sporoplasma, elemento infettante contenuto all'interno della spora, viene inoculato nelle cellule intestinali attraverso un "tubo polare", estroflesso in seguito allo stimolo di fattori fisici e chimici. Lo sporoplasma può permanere nella cellula o passare nel torrente circolatorio per raggiungere gli organi bersaglio, che possono differire in relazione alla specie parassitaria, veicolato da macrofagi o leucociti. Una volta giunto all'interno delle cellule di elezione, il parassita ha una fase proliferativa detta merogonia (o anche schizogonia) che produce un elevato numero di meronti, che in una seconda fase (sporogonia) generano spore mature (Dyková, 1999). La cellula diventa ipertrofica e appare repleta di forme parassitarie a diverso stadio evolutivo: meronti (di forma rotondeggiante od ovale), sporonti, sporoblasti e spore mature (Lom & Dyková 1992). In alcune specie lo sporonte può indurre la formazione di una membrana esterna, dando luogo ad una "vescicola sporofora" o pansporoblasto.

In alcuni generi (*Glugea*, *Loma*, *Spraguea*, *Ichthyosporidium*, ecc.) la cellula infetta viene stimolata fino ad assumere l'aspetto di una cellula abnormemente ipertrofica, con il citoplasma completamente occupato dai parassiti e con la membrana citoplasmatica che assume una maggiore permeabilità. Tale cellula prende il nome di "xenoma" (Keeling & Fast, 2002). Nello xenoma le spore mature si dispongono in genere al centro della cellula, mentre quelle ai primi stadi di sviluppo si irradiano alla periferia. Lo xenoma, che rappresenta un tipico "complesso ospite-parassita", forma un'entità separata nell'organismo a spese del quale si accresce e può raggiungere dimensioni superiori a 500 µm divenendo rilevabile macroscopicamente in forma di noduli biancastri. Lo xenoma può rilasciare spore nel tessuto circostante in seguito a degenerazione.

Altri generi di microsporidi (*Pleistophora*, *Heterosporis*, *Kabatana*, ecc.) non danno invece luogo alla formazione di xenomi. Essi generalmente invadono le cellule della muscolatura scheletrica sostituendosi al sarcoplasma e, quando tutta la cellula è invasa, si ha lisi con la liberazione delle spore. Queste ultime, generalmente di forma ellissoidale, appaiono essere molto resistenti nell'ambiente esterno ed in acqua possono sopravvivere anche per un anno a temperature intorno a 40° C (Dyková, 1999).

Numerose sono le descrizioni d'infezioni da microsporidi a livello della muscolatura scheletrica, spesso riferite al genere *Microsporidium* Balbiani, 1884, in cui Sprague (1977)

aveva compreso specie di incerta classificazione. Va comunque sottolineato che le microsporidiosi dei pesci marini sono state meno studiate rispetto a quelle dei pesci d'acqua dolce e rare sono le segnalazioni nel mar Mediterraneo.

Recentemente in sostituzione di *Microsporidium* è stato proposto il genere *Kabatana* (*Kabataia*) per comprendere le specie di microsporidi che causano infezioni muscolari nei pesci (Lom *et al.*, 1999; 2000).

Oltre a rappresentare un grave rischio sanitario, i microsporidi a localizzazione muscolare possono gravemente compromettere il valore commerciale dei prodotti d'acquacoltura.

Viene qui descritto un episodio di microsporidiosi muscolare in orate (*Sparus aurata*) allevate in Sardegna.

## MATERIALI E METODI

In un allevamento intensivo sito in Sardegna, si è avuta occasione di osservare, durante il periodo estivo, un episodio di mortalità in orate (*Sparus aurata*). L'episodio si è verificato in due vasche di 115 e 260 m<sup>3</sup>, entrambe rivestite in PVC e di forma circolare, in cui erano stabulate rispettivamente 11.100 orate di 140-150 g. di peso medio e 22.800 orate di peso compreso tra 110 e 120 g. I valori della temperatura dell'acqua si aggiravano intorno a 23° C e la salinità era del 40‰.

La mortalità, dopo essersi protratta per circa una settimana con valori di 20-30 soggetti deceduti/giorno nella prima vasca e 5-8 soggetti/giorno nella seconda, ha presentato un improvviso picco di mortalità (750 e 350 orate morte/vasca rispettivamente) in corrispondenza di un intervento gestionale che ha richiesto l'abbassamento del livello dell'acqua ed il mantenimento di una elevata densità di biomassa per alcune ore. In questa occasione i pesci andavano rapidamente incontro a morte dopo aver mostrato segni di grave atassia natatoria.

Dieci orate sono state prelevate durante il picco di mortalità ed inviate al laboratorio per accertamenti diagnostici. Su tutti i soggetti sono stati eseguiti esami necroscopici, parassitologici a fresco ed istopatologici su: cute, muscolo, branchie, fegato e milza. Gli organi sono stati fissati in formalina neutra tamponata al 10% ed inclusi in paraffina; le sezioni, dello spessore di 6 µm, sono state colorate con Ematossilina-Eosina (E-E), Giemsa (G), Periodic Acid Schiff (PAS), Tricromica di Crossmonn e Ziehl-Neelsen (ZN).

Da cervello e rene di tutti i soggetti è stato condotto l'esame culturale per batteri utilizzando Tryptone Soy Agar (TSA) + 2% NaCl, Agar Sangue (AS) e Thiosulphate Citrate Bile Sucrose Agar (TCBS Agar); le piastre sono state incubate a 25° C ± 1 per 7 giorni.

Il giorno successivo all'episodio di mortalità verificatosi durante le operazioni gestionali, il numero di soggetti morti si riduceva a 50, nella vasca di minor volume ed a 30 nella vasca più grande, per poi arrestarsi del tutto nell'arco di 3-4 giorni.

Per tutto il mese successivo sono stati effettuati esami necroscopici, parassitologici e batteriologici su circa 10 soggetti/settimana.

## RISULTATI

Alla necroscopia, tutte le orate moribonde o morte, mostravano nella muscolatura scheletrica laterale e dorsale, formazioni cistiche biancastre in alcuni casi prominenti sulla superficie cutanea, di forma ovoidale in sezione longitudinale e di lunghezza compresa tra 1 e 10 mm e diametro di 1-2 mm (fig. 1). Esse erano agevolmente enucleabili dal muscolo circostante, che appariva gelatinoso, viscido e di consistenza diminuita.

All'esame microscopico a fresco le formazioni cistiche risultavano formate da aggregati di spore (fig. 2); queste ultime avevano forma ellittica, grandezza uniforme (3,5-4 x 2-2,5 µm) ed erano dotate di un cospicuo vacuolo posteriore che oltrepassava la metà del corpo. Le caratteristiche morfologiche hanno permesso di riferirle al phylum Microspora.

All'esame istologico della muscolatura scheletrica si osservavano, a piccolo ingrandimento, formazioni cistiche di varia dimensione e morfologia (sferiche o lobate) (figg. 3 e 4), che a maggiore ingrandimento si rivelavano aggregati di spore di microsporidi non delimitati da parete esterna (fig. 4). Le spore apparivano densamente ammassate ed a diverso stadio di sviluppo, immature (meronti) alla periferia e mature al centro degli aggregati (fig. 5). Non è mai stata evidenziata la presenza di vescicole sporofore.

Le formazioni cistiche si identificavano come fibre muscolari totalmente invase dai parassiti e fuse tra loro, nelle quali le miofibrille non erano più evidenziabili. Il tessuto muscolare circostante si presentava atrofico (fig. 3) od in necrosi colliquativa, con aspetto spongioso in prossimità delle spore.

In tutta la muscolatura scheletrica erano presenti vaste aree in degenerazione ialina, con infiltrazione leucocitaria, emorragie disseminate, ispessimento dell'endomisio e del perimisio e fibrosi. Attorno alla maggior parte degli aggregati parassitari la flogosi era modesta e solo in alcuni casi, quando tutte le spore erano mature e le lesioni erano più superficiali, in prossimità del derma, si osservava reazione granulomatosa con fagocitosi di spore ad opera dei macrofagi (fig. 6).

Branchie, fegato e milza non mostravano alterazioni patologiche.

L'esame parassitologico non ha rivelato la presenza di parassiti in altri organi e l'esame batteriologico ha dato sempre esito negativo.

Solo uno dei soggetti esaminati nel mese successivo al verificarsi del picco di mortalità ha presentato rare formazioni cistiche con spore di microsporidi nella muscolatura scheletrica; tutti gli altri sono risultati sempre negativi all'esame parassitologico e non hanno mai mostrato lesioni di rilievo.

## DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

A tutt'oggi sono stati descritti solo due casi di microsporidiosi muscolare in orate allevate nel mar Mediterraneo. Mathieu-Daude *et al.* (1992) hanno segnalato un episodio di microsporidiosi da *Glugea* sp. in giovani orate allevate in Francia, mentre Abela *et al.* (1996) hanno descritto la presenza di *Pleistophora* sp. in orate allevate in gabbie galleggianti a Malta.

In Italia una grave infezione muscolare da microsporidi è stata segnalata da Giuffrida *et al.* (1997) in orate prelevate dal mercato ittico e provenienti da Malta. Gli autori, in base alle lesioni istopatologiche ed alla presenza di xenomi, hanno ritenuto che il parassita appartenesse al genere *Glugea*.

Nelle orate da noi esaminate non è stata riscontrata la presenza di xenomi, caratteristica che ha permesso di escludere l'appartenenza dei microsporidi reperiti al genere *Glugea*. D'altro canto la disposizione dei meronti alla periferia degli aggregati parassitari e l'assenza di vescicole sporofore ha fatto escludere anche il genere *Pleistophora* (Lom & Dyková, 1992).

Le lesioni e gli aspetti microscopici da noi osservati mostrano analogie con descrizioni fatte in precedenza da altri autori in corso di infezioni sostenute dal genere *Kabatana* (*Kabataia*), posto recentemente in sinonimia con il genere *Microsporidium* (Lom *et al.*, 1999; Dyková & Lom, 2000; Lom *et al.*, 2000; Lom *et al.*, 2001).

Va comunque specificato che la conferma dell'identificazione di genere e la tipizzazione della specie potrà avvenire solo mediante studi di microscopia elettronica e approfondimenti biomolecolari.

Bell *et al.* (2001), in base a studi condotti sull'ITS (internal transcribed spacers) rDNA, hanno potuto riscontrare un'elevata percentuale d'identità tra alcune specie appartenenti al genere *Microsporidium* (*Kabatana*) e microsporidi non identificati isolati dal tessuto muscolare di sparidi, fra cui orate di origine maltese.

I fenomeni di necrosi colliquativa del muscolo da noi osservati sono stati già descritti da altri autori in corso di microsporidiosi muscolare (Reichenbach-Klinke & Elkan, 1965; Pulsford & Matthews, 1991). Anche il rilevamento di flogosi marcata solo in corrispondenza di aggregati di spore mature è in accordo con le osservazioni di altri autori (Dyková & Lom, 1980).

In conclusione, nell'ambito dell'episodio da noi descritto si ritiene che la presenza del parassita possa aver indotto il verificarsi della mortalità dei soggetti colpiti in concomitanza dell'intervento terapeutico e dello stress da esso causato.

L'importanza sanitaria che i microsporidi a tropismo muscolare potrebbero assumere in acquacoltura non va sottovalutata sia in riferimento al loro effetto patogeno sull'ospite sia per le ripercussioni sul valore commerciale del prodotto ittico.

#### RINGRAZIAMENTI

Ricerca eseguita con fondi del Ministero delle Politiche Agricole e Forestali.

Gli autori ringraziano la signora Patrizia De Matteo per la collaborazione tecnica prestata nell'allestimento dei preparati istologici.

#### BIBLIOGRAFIA

Abela M., Brinch-Iversen J., Tanti J. & Le Breton A. (1996). Occurrence of a new histozoic microsporidian (Protozoa, Microspora) in cultured gilt head sea bream *Sparus aurata* L. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 16, 6: 196-199.

Bell A.S., Aoki T. & Yokoyama H. (2001). Phylogenetic relationships among Microsporidia based on rDNA sequence data, with particular reference to fish-infecting *Microsporidium* Balbiani 1884 species. *J. Euk. Microbiol.*, 48, 3: 258-265.

Canning E. & Lom J. (1986). The Microsporidia of Vertebrates. *Academic Press, New York, USA*.

Dyková I. (1999). Phylum Microspora. In: *Fish Diseases and Disorders. Volume 1 Protozoan and Metazoan Infections*. P.T.K. Woo (Ed.), CABI Publishing, New York: 149-179.

Dyková I. & Lom J. (1980). Tissue reactions to microsporidian infections in fish. *J. Fish Dis.*, 3: 265-283.

Dyková I. & Lom J. (2000). Histopathology of *Kabatana arthuri* (Microspora) infection in sutchi catfish, *Pangasius sutchi*. *Folia Parasitologica*, 47: 161-166.

Dogiel V.A., Petrushevski G.K. & Polyanski Y.I. (Eds.) (1958). Parasitology of Fishes. *Translated by Z. Kabata, Marine Laboratory, Aberdeen, 1970 by T.H.F., Publications: 384*.

- Franzen C. & Müller A. (1999). Molecular techniques for detection, species differentiation, and phylogenetic analysis of Microsporidia. *Clin. Microbiol. Rev.*, 12, 2: 243-285.
- Giuffrida A., Iovino F. & Riili S. (1997). Microsporidiosi muscolare in *Sparus aurata*. Rilievi anatomo-istopatologici e considerazioni igienico-sanitarie ed ispettive. *OD&V*, 9: 73-76.
- Haley A.J. (1954). Microsporidian parasite, *Glugea hertwigi*, in American smelt from the Great Bay region, New Hampshire. *Trans. Am. Micros. Soc.*, 83: 84-90.
- Keeling P.J. & Fast N.M. (2002). Microsporidia: biology and evolution of highly reduced intracellular parasites. *Annu. Rev. Microbiol.*, 56: 93-116.
- Larsson J.I.R. (1999). Identification of Microsporidia. *Acta Protozool.*, 38: 161-197.
- Lom J. & Dyková I. (1992). Protozoan parasites of fishes. *Elsevier Amsterdam*: 314.
- Lom J., Dyková I. & Tonguthai K. (1999). *Kabataia* gen. n., a new genus proposed for *Microsporidium* spp. infecting trunk muscles of fishes. *Dis. Aquat. Org.*, 38: 39-46.
- Lom J., Dyková I. & Tonguthai K. (2000). *Kabatana* gen. n., new name for the microsporidian genus *Kabataia* Lom, Dyková et Tonguthai, 1999. *Folia Parasitologica*, 47: 78
- Lom J. & Nilsen F. (2003). Fish microsporidia: fine structural diversity and phylogeny. *Int. J. Parasitol.*, 33: 107-127.
- Lom J., Nilsen F. & Urawa S. (2001). Redescription of *Microsporidium takedai* (Awakura, 1974) as *Kabatana takedai* (Awakura, 1974) comb. n. *Dis. Aquat. Org.*, 44: 223-230.
- Mathieu-Daude F., Faye N., Coste F., Manier J.F., Marques A. & Bouix G. (1992). Occurrence of a microsporidiosis in marine cultured gilt-head sea bream from the Languedoc coast: a problem of specificity in the genus *Glugea* (Protozoa, Microspora). *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 12, 2: 67-70.
- Pulsford A. & Matthews R. A. (1991). Macrophages and giant cells associated with a microsporidian parasite causing liquefaction of skeletal muscle of the Norway pout, *Trisopterus esmarkii* (Nilsson). *J. Fish Dis.*, 14: 67-78.
- Reichenbach-Klinke H. & Elkan E. (1965). The principal disease of lower vertebrates. Diseases of fishes. *THF Publications. Copyright by Academic Press Inc. (London) LTD*: 205.
- Shaw R.W. & Kent M.L. (1999). Fish Microsporidia. In: *The Microsporidia and Microsporidiosis. Murray Wittner (Eds)*, 13: 418-446.
- Sindermann C.J. (1990). Principal diseases of marine fish and shellfish. 2<sup>nd</sup> Edition. Vol. 1. Diseases of marine fish. *Academic Press, Inc. Harcourt Brace Jovanovich, publishers, San Diego*.
- Sprague V. (1977). Classification and phylogeny of the Microsporidia. In: *Bulla L.A. Jr & Cheng T.C. (Ed.), Comparative Pathobiology, Vol. 2, Systematics of the Microsporidia. Plenum Press, New York*.
- Wittner, M. & Weiss L. (1999). The Microsporidia and microsporidiosis. *ASM Press, Washington, D.C.*: 553.

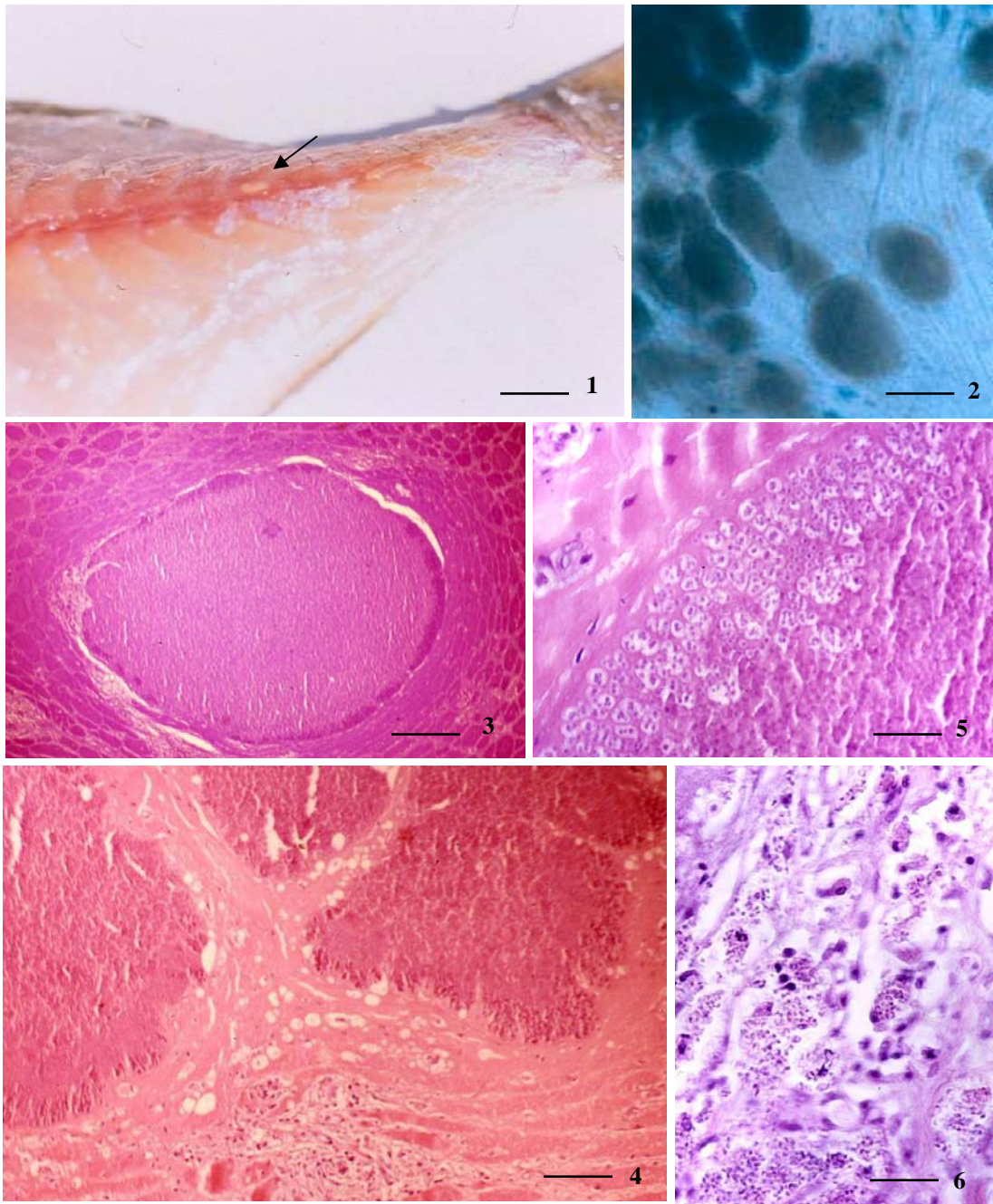


Fig. 1 - Immagine macroscopica di formazione cistica da microsporidi nel muscolo laterale di orata (freccia).  
 Fig. 2 - Preparato a fresco di tessuto muscolare di orata con diffusi ammassi di spore di microsporidi: immagine microscopica. Fig. 3-6 - Sezioni istologiche di tessuto muscolare di orata: 3 - Formazione cistica contenente microsporidi circondata da tessuto muscolare parzialmente atrofico. 4 - Ampii ammassi di microsporidi non delimitati da parete esterna. 5 - Particolare di cisti di microsporidi, con stadi immaturi (meronti) alla periferia e spore mature al centro. 6 - Macrofagi infarciti di spore di microsporidi nel tessuto connettivo del derma.  
 Fig. 1 - Macroscopic appearance of a microsporidian cyst in lateral muscle of gilthead sea bream (arrow).  
 Fig. 2 - Fresh mount of muscular tissue with aggregates of microsporidian spores: light micrograph. Fig. 3-6 - Histological sections of lateral muscle of gilthead sea bream: 3 - Cyst-like aggregate of microsporidian spores, surrounded by partially atrophic muscle. 4 - Large aggregates of microsporidian spores not circumscribed by external wall. 5 - Particular of a microsporidian cyst showing immature stages (meronts) at the periphery and mature spores in the centre. 6 - Macrophages replete with microsporidian spores in dermal connective tissue.  
**Bars: 1. 16 mm; 2. 300 µm; 3. 55 µm; 4. 60 µm; 5. 160 µm; 6. 180 µm.**