

**Segnalazione di micosi sistemica in
ombrine boccadoro (*Argyrosomus regius*)
allevate intensivamente**

*Outbreak of systemic mycosis in intensively reared
meagre (*Argyrosomus regius*)*

**Elisabetta Manuali*, Francesco Agnetti, Mario Latini,
Simona Checcarelli, Claudio Ghittino**

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

RIASSUNTO – Negli organismi acquatici le lesioni cutanee a carattere ulcerativo possono essere determinate da diverse componenti eziologiche comprendenti agenti infettivi e/o infestivi, sostanze chimiche ad azione irritante o caustica, fenomeni di natura fisica, fattori immunologici, disturbi metabolici e/o di origine nutrizionale. L'andamento cronicizzato può facilitare l'intervento di agenti d'irruzione secondaria a seguito delle lesioni cutanee presenti sui soggetti già debilitati dalla patologia preesistente. Numerose sono le segnalazioni che documentano il ruolo dei funghi quali responsabili di complicanze secondarie, in grado quindi di aggravare la patologia preesistente: *Saprolegnia* spp. ed altre tipiche muffe capaci di vivere in ambiente acquatico, rappresentano i più frequenti agenti di irruzione secondaria sulla cute di soggetti predisposti e/o debilitati da patologie di varia natura. Scopo della presente nota è quello di descrivere un caso di micosi sistemica in ombrine boccadoro allevate intensivamente e monitorate dal 2003 per la presenza di Granulomatosi Sistemica di origine nutrizionale. Da ogni organo sede di lesione, sottoposto ad esame colturale per miceti, è stata osservata la crescita in purezza di colonie fungine identificate come appartenenti alla specie *Penicillium digitatum*; l'esame istologico degli stessi tessuti ha evidenziato la presenza di aggregati di ife settate e PAS positive. Sebbene i miceti appartenenti al genere *Penicillium* siano considerati appartenenti alla flora saprofitica acquatica, lo stato debilitante indotto dalla patologia primaria potrebbe averne consentito la penetrazione attraverso la via transcutanea e/o branchiale e la successiva diffusione agli organi interni.

SUMMARY – Different factors, including infectious agents and nutritional or metabolic perturbations, can cause ulcers in the fish skin. Pathogenic or environmental fungi are often associated with a variety of skin diseases in fish, as well as in other animals. In this work, a syndrome observed in meagre (*Argyrosomus regius*) characterized by the presence of ulcers located on the head and on the ventral region, and nodular lesions in kidney, liver, spleen and heart, is described. While bacteriological and parasitological examinations were constantly negative, mycological tests revealed the growth of fungal colonies, which were later identified as *Penicillium digitatum*. Histologically, a marked chronic inflammatory infiltrate was noticed in all organs, associated with the presence of granulomas and fungal hyphae.

Key words: Systemic granulomatosis, Meagre, *Argyrosomus regius*, *Penicillium digitatum*.

* Corresponding Author: c/o Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Via G. Salvemini, 1 - 06126 Perugia. Tel. 075-343227; Fax 075-343289; E-mail: e.manuali@pg.izs.it.

INTRODUZIONE

L'ombrina boccardoro (*Argyrosomus regius*) è una specie emergente in maricoltura, caratterizzata da rapido incremento ponderale, destante interesse per il suo potenziale ruolo di specie alternativa a quelle già allevate intensivamente. Risulta però sensibile a numerose *noxae* patogene e tra queste, quelle che si esprimono con quadro anatomo-patologico di tipo granulomatoso. Lesioni viscerali a carattere nodulare possono reperirsi in seguito a patologie di natura infettiva, parassitaria o nutrizionale. Germi acido-resistenti, come quelli appartenenti ai generi *Mycobacterium* e *Nocardia*, sono da tempo riconosciuti responsabili di malattie ad andamento enzootico, contraddistinte da lesioni granulomatose (Valdez & Conroy, 1963; Ribelin & Migaki, 1975) e vengono a tutt'oggi considerati degli agenti zoonosici di malattia, in particolare nei soggetti immunocompromessi (Young *et al.*, 1971). Alcuni funghi possono avere un comportamento subdolo ed in grado di indurre eventi patologici cronicizzanti; quelli appartenenti ai generi *Aphanomyces* e *Fusarium* possono causare malattie primarie e a carattere sistemico in condizioni di alterata temperatura e salinità dell'acqua, così come *Ichthyophonus hoferi* è responsabile di lesioni granulomatose che circondano ed inglobano le formazioni fungine nei loro diversi stadi di sviluppo (Lilley & Roberts, 1997; Rahimian, 1998). Numerose sono le segnalazioni che documentano il ruolo dei funghi quali responsabili di complicanze secondarie, in grado quindi di aggravare una patologia preesistente: *Saprolegnia* spp. ed altre tipiche muffe capaci di vivere in ambiente acquatico, rappresentano i più frequenti agenti di irruzione secondaria sulla cute di soggetti predisposti e/o debilitati da patologie di varia natura (Ghittino, 1985). Sulla base di quest'ultima considerazione, il presente lavoro ha lo scopo di descrivere, da un punto di vista clinico ed anatomo-istopatologico, un caso di micosi sistemica riscontrato in ombrine boccardoro allevate intensivamente e già monitorate dal 2003 in seguito a precedente diagnosi di Granulomatosi Sistemica (GS) di origine nutrizionale (Ghittino *et al.*, 2004).

MATERIALI E METODI

Le vasche oggetto di monitoraggio sono state sottoposte a controllo semestrale, con l'obiettivo di valutare l'andamento della GS. Gli esemplari selezionati avevano un'età di circa 2 anni ed un peso variabile tra i 2 e i 3 kg: da un punto di vista clinico mostravano un modico calo dell'appetito, presenza di chiazze emorragiche spesso ulcerate disseminate soprattutto nella regione ventrale e in corrispondenza dell'inserzione delle pinne, assenza di anomalie nel comportamento natatorio. I soggetti con quadro clinico peggiore sono stati sacrificati previa overdose di anestetico MS222 e sottoposti ad esame anatomo-istopatologico, con accertamenti diagnostici di tipo batteriologico, parassitologico, micologico e ultrastrutturale.

L'esame anatomo-patologico è stato eseguito secondo la metodica standard, effettuando un primo taglio lungo la linea ventrale mediana partendo dall'orificio anale ed arrivando fino allo spazio interopercolare, seguito da un secondo taglio lungo una linea curva sul fianco sinistro del pesce, partendo sempre dall'orificio anale e arrivando al bordo superiore dell'opercolo sinistro.

L'esame istologico è stato effettuato su cute, rene, milza, fegato e cuore. Gli organi sono stati fissati in formalina tamponata al 10% ed inclusi in paraffina; sezioni di 5-6 µm di spessore sono state colorate con Ematossilina-Eosina (E-E), Periodic Acid Schiff (PAS), Ziehl-Neelsen (Z-N) ed analizzate al microscopio ottico.

Il prelievo per l'esame batteriologico standard è stato effettuato in parallelo dal rene e dalle lesioni cutanee; il materiale è stato seminato su Agar sangue ed incubato a 22° C per 48-72 ore; le stesse matrici sono state saggiate anche per la ricerca di *Nocardia* spp., utilizzando

Agar sangue, agar infuso di cuore e cervello (BHI) e agar destrosio Sabouraud, incubati tutti (triplice semina) a 25°, 37° e 42° C (Koneman, 1995) per 4-6 settimane. Il materiale è stato inoltre sottoposto a decontaminazione con HPC all'1,5% per cinque ore, seminato su tubi di Löwenstein-Jensen, e successivamente incubato a 28° e a 37° C per due mesi, per l'eventuale isolamento di *Mycobacterium* spp. (Prearo *et al.*, 2002).

L'esame parassitologico a fresco è stato eseguito a partire da raschiati di cute e branchie (mediante grattamento delle superfici con vetrino coprioggetto); il prelievo cutaneo è stato realizzato soprattutto in corrispondenza dell'inserzione della pinna dorsale; i campioni ottenuti, posti poi su vetrino portaoggetto, sono stati osservati al microscopio ottico.

Il prelievo per l'esame micologico è stato effettuato in parallelo da milza, cuore, rene e dalle lesioni cutanee; il materiale è stato seminato su agar destrosio Sabouraud ed incubato a 22° e a 30° C per 6-12 giorni. In caso di positività, le colonie sono state identificate macro e microscopicamente. Per l'identificazione macroscopica si sono osservati il colore della superficie e del fondo, nonché l'aspetto morfologico delle colonie. Per l'identificazione microscopica si è proceduto a stemperare un frammento di colonia in una goccia di H₂O distillata su un vetrino portaoggetto, colorandola poi con una goccia di blu di metilene; posto il vetrino coprioggetto, il preparato è stato osservato al microscopio ottico (40x, 100x), con la finalità di visualizzare la morfologia delle ife e l'eventuale presenza di organi riproduttivi fungini (Polonelli *et al.*, 1994).

Per l'indagine di microscopia elettronica a trasmissione, campioni di tessuto sono stati fissati in glutaraldeide al 2%, post-fissati in osmio all'1%, disidratati attraverso la serie crescente degli alcool, incubati in ossido di propilene ed inclusi in Epon 812. Sezioni ultrafini, colorate con acetato di uranile e citrato di piombo, sono state osservate a 80 kV utilizzando il microscopio elettronico CM 12 STEM (Philips).

RISULTATI

All'esame clinico gli esemplari più gravemente interessati, del peso di 2-3 kg, mostravano esoftalmo bilaterale e cheratite, associati a lesioni cutanee a carattere ulcerativo, disseminate principalmente sulla testa, sulle regioni dei fianchi e dell'addome ed in prossimità dell'inserzione della pinna dorsale (Fig. 1). L'esame necroscopico ha evidenziato l'esistenza di lesioni granulomatose in sede renale, splenica, epatica e cardiaca, con particolare coinvolgimento delle sierose viscerali, che sono risultate sede di processi fibrinosi (Fig. 2). In corrispondenza delle lesioni più estese, osservabili soprattutto nei soggetti adulti, l'esame istologico della cute ha evidenziato la presenza di aree necrotiche ulcerate, estese fino al derma e spesso infiltranti i piani muscolari. In tutte queste sedi, si sono riscontrate lesioni granulomatose multifocali, spesso confluenti, aventi un centro necrotico calcificato e delimitato da aggregati filamentosi settati eosinofili (Fig. 3). La colorazione PAS ha dimostrato la natura muco-lipopolisaccaridica dei clusters eosinofili. Le lesioni erano circoscritte da una reazione fibroblastica tissutale, intensamente proliferata nei noduli più estesi, tanto da formare una spessa capsula. Nelle lesioni a carattere infiltrante l'essudato infiammatorio, composto prevalentemente da granulociti, coinvolgeva il tessuto adiposo e si interponeva tra i fasci muscolari provocando edema delle fibre; la sezione muscolare ha evidenziato foci di necrosi ed una intensa reazione granulomatosa. Le lesioni granulomatose si sono riscontrate inoltre a carico dei principali organi della cavità celomatica, con particolare coinvolgimento delle sierose viscerali, risultate sede di processi fibrinosi. Le lesioni cardiache erano localizzate principalmente sulla sierosa pericardica, notevolmente ispessita a seguito della reazione granulomatosa (Fig. 4).

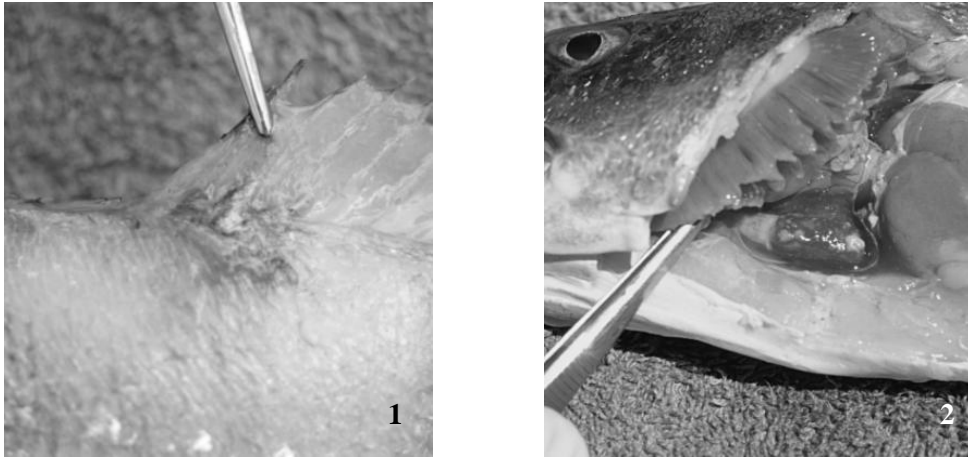


Figura 1 – Lesioni cutanee, intensamente congeste ed a margini irregolari, in corrispondenza dell’inserzione della pinna dorsale.

Figure 1 – Cutaneous lesions around the dorsal fin.

Figura 2 – Pericardite fibrinosa con noduli di varie dimensioni e spesso confluenti.

Figure 2 – Fibrinous pericarditis with nodules.

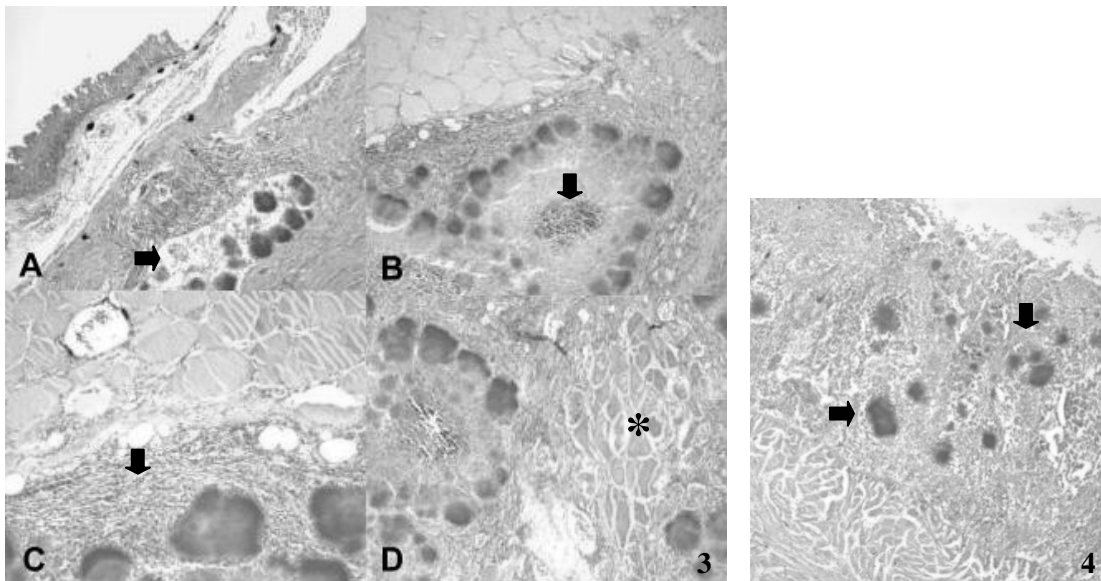


Figura 3 - Cute: lesioni granulomatose che mostrano la presenza di: (A) clusters micotici spesso contenuti all’interno di formazioni vacuolari (freccia), (B) provviste di un centro calcificato (freccia), (C) circoscritte da spessa capsula fibro-connettivale (freccia), (D) che si estendono fino ad infiltrare lo strato muscolare (asterisco) (E-E x 10, 20, 40, 20).

Figure 3 – Skin: ulcers harboring (A) mycotic clusters within vacuolar formations (arrow), (B) having a calcified center (arrow), (C) surrounded by a thick fibroconnective capsule (arrow), (D) infiltrating the muscular layer (asterisk) (H-E x 10, 20, 40, 20).

Figura 4 – Pericardite fibrinosa con ampio ispessimento della sierosa viscerale e presenza di aggregati fungini (freccie) (E-E x 10).

Figure 4 – Fibrinous pericarditis with thickening of the visceral serosa and presence of mycotic aggregates (arrows)(H-E x 10).

La distribuzione multifocale dei noduli, costituiti da aggregati filamentosi con disposizione “a raggera”, PAS positivi, era associata alla presenza di una reazione mesenchimale di tipo mixoide e rari granulociti. Di riscontro occasionale la presenza di emboli endovasali costituiti da aggregati filamentosi settati, già descritti nelle lesioni cutanee. Dall’esame istologico condotto su rene e milza è emerso lo stesso quadro microscopico, con la presenza di foci granulomatosi di diametro variabile e con ampio centro necrotico. In corrispondenza delle strutture nodulari localizzate nella porzione più superficiale dei parenchimi renale e splenico, era ben evidente una reazione infiammatoria a carattere fibrinoso delle sierose viscerali.

L’esame batteriologico standard, nonché quello per la ricerca di *Nocardia* spp. e *Mycobacterium* spp. sono risultati negativi. L’esame parassitologico a fresco ha dato anch’esso esito negativo. L’esame colturale per miceti ha evidenziato invece la crescita in purezza, da ogni organo esaminato, di colonie a tessitura cotonosa e superficie polverulenta, con presenza frequente di solchi radiali, inizialmente bianche e sviluppano poi sfumature verdi o verde-blu; il verso di tali colonie si è presentato sempre di colore bianco. L’esame microscopico delle stesse ha evidenziato ife ialine e settate di circa 5 µm di diametro, con conidiofori eretti, a parete liscia, a uno o più stadi di ramificazione, con un tipico aspetto a pennello o spazzola e dotati di conidi sferici, di 2,5-5 µm di diametro. Le osservazioni condotte su tali colonie, hanno permesso di ascrivere le stesse al genere *Penicillium* (Andreoni *et al.*, 2003), e successivamente di identificarle come appartenenti alla specie *P. digitatum*. La microscopia elettronica a trasmissione, utilizzata con lo scopo di valutare gli aspetti ultrastrutturali dei granulomi, ha mostrato la presenza di ife settate di 5 µm di diametro, provviste di parete e composte da una porzione centrale variamente elettrondensa (Fig. 5). Tali elementi, riscontrabili esclusivamente in forma filamentosa, erano immersi in una matrice costituita da detriti cellulari.

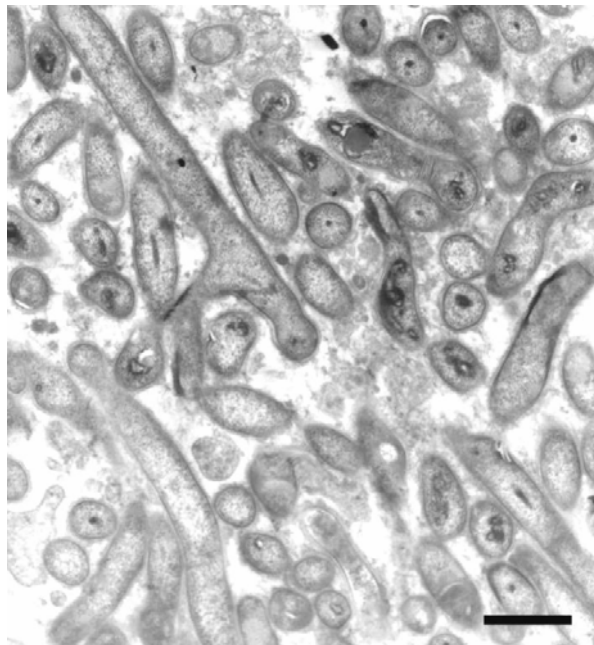


Figura 5 – Ultrastruttura delle ife: la sezione longitudinale ne evidenzia l’aspetto settato, la parete ed il “core” elettrondenso (barra: 10 µm).

Figure 5 – Hyphae ultrastructure: longitudinal section points out their septate aspect, the wall and the electrodense core. (Bar: 10 µm).

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

La descrizione di questo caso di micosi sistemica in ombrine boccadoro (*Argyrosomus regius*), origina da uno studio a lungo termine condotto in soggetti allevati intensivamente e monitorati dal 2003 per la presenza di Granulomatosi Sistemica di origine nutrizionale (Ghittino *et al.*, 2004), patologia segnalata per la prima volta nell'orata (*Sparus aurata*) ed associata principalmente a squilibri dietetici (Paperna *et al.*, 1977; Paperna *et al.*, 1980). La malattia è stata in seguito osservata nel rombo (*Scophthalmus maximus*) (Tixerant *et al.*, 1984; Messenger *et al.*, 1986; Coustans *et al.*, 1990). L'attività di monitoraggio, oltre ad evidenziare e confermare il decorso tipicamente cronico della GS, non ha permesso di riscontrare variazioni significative del tasso di mortalità. Gli accertamenti diagnostici sono risultati negativi per la presenza di germi acido resistenti (*Mycobacterium* spp., *Nocardia* spp.), batteri Gram negativi (*Photobacterium damsela*) e miceti quali *I. hoferi* responsabili di infezioni sistemiche, che si esprimono con quadro anatomopatologico di tipo granulomatoso. Sorprendentemente, l'esame su terreno Sabouraud, allestito da tessuti cutanei e viscerali, ha evidenziato la crescita in purezza di colonie fungine ascrivibili al genere *Penicillium*, successivamente identificate come appartenenti alla specie *P. digitatum*. L'aspetto microscopico delle lesioni tissutali ha confermato il carattere granulomatoso delle lesioni cutanee e viscerali, evidenziando, inoltre, aggregati filamentosi settati eosinofili e PAS positivi morfologicamente riconducibili a miceti. La microscopia elettronica a trasmissione ha confermato la natura fungina delle ife, aventi diametro di 5 µm e presenti esclusivamente in forma filamentosa.

I miceti appartenenti al genere *Penicillium* vengono considerati dei contaminanti ambientali e solo poche specie sono state segnalate in grado di dare patologie negli animali e nell'uomo. Nel caso da noi osservato, è stata dimostrata la presenza di lesioni granulomatose diffuse che non possono però essere considerate patognomoniche di un'infestazione da *Penicillium* spp. L'esito negativo ottenuto dall'esame colturale e istochimico per germi acido-resistenti, associato al dato di microscopia elettronica, ha portato ad escludere la presenza, all'interno delle lesioni granulomatose, di elementi nocardiformi, i cui filamenti caratterizzati da diametri notevolmente inferiori (fino ad 1 µm), rispetto a quelli delle ife fungine (mediamente di 5 µm).

E' ipotizzabile quindi che lo stato debilitante indotto dalla patologia nutrizionale primaria abbia consentito al micete di penetrare per via transcutanea e/o branchiale e diffondere all'interno dell'organismo, contribuendo ad aggravare lo stato sanitario dei pesci allevati e la loro qualità commerciale. Nonostante *P. digitatum* riconosca un habitat vegetale ed escludendo una contaminazione delle acque da parte di scarti di agrumi, si rendono necessari ulteriori approfondimenti per individuare nell'ombrina i possibili fattori di rischio in grado di favorire l'interazione tra agenti primari e secondari di malattia, quali ad esempio la suscettibilità di specie, la capacità di risposta del sistema immunitario, la tecnologia di allevamento.

RINGRAZIAMENTI

Gli Autori ringraziano il Prof. Josep Guarro (Unitat de Microbiologia, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Institut d'Estudis Avançats, Universitat Rovira i Virgili, Reus, Tarragona, Spagna) per l'identificazione delle colonie fungine.

BIBLIOGRAFIA

- Andreoni S., Farina C. & Lombardi G. (2003). Atlante di micologia medica. Ed. Systems, Vigano di Gaggiano (MI).
- Coustans M.F., Guillaume R., Metailler R. & Dugornay O. (1990). Effect of an ascorbic acid deficiency on tyrosinemia and renal granulomatous disease in turbot (*Scophthalmus maximus*) interaction with a slight polyhypovitaminosis. *Comp. Biochem. Physiol.* 97A, 2: 145-152.
- Ghittino C., Manuali E., Latini M., Agnetti F., Rogato F., Agonigi R., Colussi S. & Prearo M. (2004). Caso di granulomatosi sistemica in ombrina boccardoro (*Argyrosomus regius*) e raffronto con le lesioni istologiche presenti nell'orata. *Ittiopatologia*, 1: 59-67.
- Ghittino P. (1985). Tecnologia e patologia in acquacoltura. Vol. 2 - Patologia. Emilio Bono Ed., Torino.
- Koneman E.W. (1995). Testo atlante di microbiologia diagnostica. Antonio Delfino Ed., Roma.
- Lilley J.H. & Roberts R.J. (1997). Pathogenicity and culture studies comparing the *Aphanomyces* involved in epizootic ulcerative syndrome (EUS) with other similar fungi. *J. Fish Dis.*, 20: 135-144.
- Messenger J.L., Ansquer D., Metailler R. & Person-Le-Ruyet J. (1986). Experimental induction of the "granulomatous hypertyrosinemia" of reared turbot (*Scophthalmus maximus*) with an ascorbic acid deficient diet. *Ichthyophysiological Acta*, 10: 201-214.
- Paperna I., Colomi A., Gordin H. & Kissil G.W. (1977). Disease of *Sparus aurata* in marine culture at Elat. *Aquaculture*, 10: 195-213.
- Paperna I., Harrison J.G & Kissil G.W. (1980). Pathology and histopathology of a systemic granuloma in *Sparus aurata* (L.) cultured in the Gulf of Aqaba. *J. Fish Dis.*, 3: 213-221.
- Polonelli L., Ajello L. & Morace G. (1994). Micologia medica. Società Editrice Esculapio, Bologna.
- Prearo M., Latini M., Proietti M., Mazzone P., Campo Dall'Orto B., Penati V. & Ghittino C. (2002). Casi di Micobatteriosi in pesci rossi d'acquario. *Boll. Soc. It. Patol. Ittica*, 33: 30-43.
- Rahimian H. (1998). Pathology and morphology of *Ichthyophonus hoferi* in naturally infected fishes of the Swedish west coast. *Dis. Aquat. Org.*, 34, 2: 109-123.
- Ribelin W.E. & Migaki G. (1975). Fish Pathology. The University of Wisconsin Press Ltd.: 82-84.
- Tixerant G., Aldrin J., Baudin-Laurencin F. & Messenger J.L. (1984). Granulomatous syndrome and tyrosine metabolism defect in turbot (*Scophthalmus maximus*). *Bull. Académie Vétérinaire de France*, 57, 1: 75-90.
- Valdez I.E. & Conroy D.A. (1963). The study of a tuberculosis-like condition in Neon tetras (*Hyphessobrycon innessi*). II. Characteristics of the bacterium isolated. *Microbiologia Espanola*, 16: 249-253.
- Young L.S., Armstrong D., Belevins A. & Lieberman P. (1971). *Nocardia asteroides* infection complicating neoplastic disease. *Am. J. Med.*, 50: 356-367.