

Infezione da *Tetrahymena* sp. in guppy (*Poecilia reticulata*) di recente importazione

Tetrahymena sp. infection: outbreak of disease in recently imported guppies (*Poecilia reticulata*)

Cristian Salogni^{1*}, Daniela Gelmetti², Giovanni Loris Alborali¹

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, Via A. Bianchi, 9 -
25100 Brescia;

² Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, Via Celoria, 12 - 20133 Milano

RIASSUNTO – Una malattia sostenuta da protozoi ciliati istofagi del genere *Tetrahymena* e denominata anche “Guppy Disease”, rappresenta un serio problema negli allevamenti di Poecilidi del Sud-Est asiatico. Essa è infatti responsabile di alta mortalità, specialmente durante o dopo il trasporto dei pesci ornamentali. A ciò si accompagna anche la difficoltà del trattamento terapeutico e la possibilità di diffusione a numerose specie ittiche. Nel presente lavoro viene descritto un episodio di tale malattia avvenuto nella primavera del 2005 in una rivendita di pesci ornamentali del nord Italia. La patologia ha interessato una partita di guppy (*Poecilia reticulata*) recentemente importati dalla Malesia. Gli esemplari mantenuti in una vasca di quarantena erano in buono stato di nutrizione nonostante qualche esemplare presentasse atassia locomotoria e presenza di aree discromiche biancastre, localizzate prevalentemente sul dorso. In breve tempo la sintomatologia si è estesa a tutto il gruppo con comparsa di profonde ulcerazioni della muscolatura scheletrica. La mortalità rimaneva alta nonostante i trattamenti terapeutici nel frattempo intrapresi. Le indagini di laboratorio effettuate su un campione rappresentativo hanno riguardato: l'esame anatomopatologico, il colturale per la ricerca di agenti batterici, il microscopico a fresco per i parassiti e quindi l'istologico. In tutti gli esemplari esaminati è stata possibile rilevare una massiva infestazione da *Tetrahymena* sp. L'esame istologico, infine, ha confermato la gravità delle lesioni valutate in sede autoptica, nonché la massiva infestazione parassitaria.

SUMMARY – The Guppy Disease, caused by histophagous ciliates belonging to the genera *Tetrahymena* is responsible for high mortality in cultures of *Poecilidae* in South-East Asia, especially during and after transport. Therapeutic treatment proved to be difficult. This work describes a case of tetrahymenosis in a stock of guppies recently imported from Malaysia to northern Italy in spring of 2005. The fish appeared to be in good nutritional state even though some were ataxic and presented some white patches especially on the back. In a few days the disease spread to the entire stock and deep ulceration in muscles appeared. Treatments using antibiotics and disinfectants did not stop the mortality which reached 60%. *Tetrahymena* sp. was found in large numbers in every sample. Histological analyses confirmed the presence of deep lesions and the massive infestation of parasites.

Key words: Ulcerative disease, Guppy Disease, *Tetrahymena*, *Poecilia reticulata*.

* Corresponding Author: c/o Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Via A. Bianchi, 9 - 25124 Brescia; Tel. +39 030 2290271; Fax +39 030 2290552; E-mail: ittiopatologia@bs.izs.it.

INTRODUZIONE

Il commercio mondiale di pesci ornamentali ha raggiunto a livello mondiale un fatturato di notevole importanza. L'allevamento dei pesci ornamentali rappresenta una branca dell'acquacoltura a pieno titolo non solo dal punto di vista economico, ma anche per le molteplicità delle modalità di allevamento delle numerosissime specie ornamentali (e loro selezioni) richieste dal mercato mondiale e per le patologie ad esse correlate.

La possibilità di veicolare in breve tempo, da un capo all'altro dell'emisfero, partite anche considerevoli di pesci vivi, genera notevoli rischi di diffusione di agenti patogeni esotici. Molte malattie infettive hanno causato negli ultimi anni, come conseguenza dell'allevamento intensivo e della carenza di controlli sanitari e di sistemi di quarantena efficienti, seri problemi (Lim *et al.*, 2003). Una di queste malattie, di natura parassitaria, è la Tetrahymenosi, denominata "Guppy Disease" per la particolare diffusione in *Poecilia reticulata* (Imai *et al.*, 2000). La malattia emersa in forma grave nel Sud-Est asiatico, dove si è endemizzata soprattutto negli allevamenti all'aperto, si è attualmente diffusa a livello mondiale come conseguenza del sempre più intenso commercio dei pesci ornamentali (Kim *et al.*, 2002; Thilakaratne *et al.*, 2003).

Al genere *Tetrahymena* (Ciliophora: Oligohymenophorea) appartengono specie che nonostante le numerose varietà possono essere distinte in funzione delle caratteristiche ecologiche, filogenetiche e in parte morfologiche. I più recenti studi genetici hanno dimostrato la derivazione del *T. rostrata*-complex, a cui appartengono le specie parassite istofaghe da un progenitore ancestrale batteriofago a vita libera (Strüder-Kypke *et al.*, 2001). Il ciclo biologico di tali specie appare abbastanza complesso (Lynn, 1975), comprendente la possibilità di formare delle cisti riproduttive e trasformazioni morfologiche. All'interno di questo complesso di specie, alcune dimostrano una maggiore tendenza alla vita libera (*T. bergeri*, *T. mobilis*, *T. setosa*) rispetto ad altre che si comportano da parassiti facoltativi (*T. corlissi*, *T. rostrata*) od obbligati (*T. empidokyrea*).

Scarse o assenti sono le notizie sulla diffusione nel nostro Paese del patogeno nei pesci ornamentali allevati o d'importazione (Manfrin *et al.*, 2002).

Le specie ittiche ornamentali maggiormente suscettibili alla parassitosi sono i Poecilidi ed in modo particolare il guppy (*Poecilia reticulata*) ed il platy (*Xiphophorus maculatus*), sebbene moltissime altre specie possano essere colpite, anche con mortalità elevate come nel caso del zebrafish (*Brachydanio rerio*) (Astrofsky *et al.*, 2002). Alcuni pesci d'acquario risultano invece del tutto resistenti (*Corydoras sp.*) (Ponpornpisit *et al.*, 2000).

La parassitosi è stata segnalata anche in specie ittiche allevate a scopo alimentare (Speide, 1954; Ferguson *et al.*, 1987). Protozoi del genere *Tetrahymena* sono coinvolti in numerosi casi di infestazione di invertebrati (anellidi, gasteropodi, crostacei, insetti) e vertebrati (anfibi, mammiferi) (Nigrelli *et al.*, 1956; Kozloff, 1957; Seaman *et al.*, 1972; Edgerton *et al.*, 1996; Lynn *et al.*, 2000).

Tetrahymena sp. ha la capacità di sopravvivere in un'ampia gamma di condizioni ambientali (Ponpornpisit *et al.*, 2000) anche in assenza di ospiti adatti. Quando i pesci sono sottoposti a fattori stressanti (sbalzi termici, cattura, trasporto, ecc.) e a lesioni cutanee di varia natura (meccanica, chimica, fisica, infettiva/infestiva) il microrganismo è in grado di svolgere sulla cute dell'ospite un'intensa azione istofaga, con formazione di ampie ulcere penetranti la muscolatura. Il microrganismo può poi diffondersi nel resto dell'organismo portando rapidamente a morte gli animali colpiti (Noga, 1996). La capacità di indurre la malattia dipenderebbe anche dalla quantità di potenziali parassiti presenti nell'ambiente.

MATERIALI E METODI

Nella primavera del 2005, in una rivendita al dettaglio di pesci ornamentali italiana, si è verificato un episodio di mortalità in una partita di guppy (*Poecilia reticulata*) adulti maschi e femmine, di recentemente importazione dalla Malesia. Oltre ai pesci in questione erano presenti anche numerose altre specie di pesci ornamentali mantenuti in vasche indipendenti con ricircolo d'acqua e filtraggio biologico. I guppy mantenuti in una vasca di quarantena (temperatura media di 25° C) al momento dell'arrivo erano in buono stato di nutrizione, nonostante qualche esemplare presentasse nuoto dondolante e la presenza di aree discromiche biancastre localizzate prevalentemente sul dorso.

Sono pervenuti complessivamente in laboratorio 15 esemplari vivi maschi e femmine, (delle dimensioni di 4-5 cm) raccolti tra i pesci moribondi e con le lesioni cutanee più evidenti.

Tutti i pesci sono stati sottoposti ad esame anatomopatologico, ad esami routinari microscopici parassitologici a fresco da cute e branchie, microscopici con colorazione semplice (fucsina all'1%) e ad esame istologico.

Per l'esame colturale sono stati effettuati prelievi da fegato, rene, cervello e lesioni cutanee, successivamente inoculati su terreni standard generici (Agar Sangue e TSA, incubazione 48 ore a 22° C) e specifici per la ricerca di flavobatteri (Anacker Ordal Agar e Tryptone Yeast Extract Salts Agar, incubazione 5 giorni a 22° e 15° C).

Per l'esame istologico 6 esemplari di guppy mostranti lesioni cutanee a diverso stadio evolutivo sono stati fissati in formalina al 10%, inclusi in paraffina, sezionati a 4 micron e colorati con ematossilina-eosina, secondo procedure standard.

Una volta accertata la presenza dei ciliati nelle lesioni, l'identificazione del genere *Tetrahymena* è stata effettuata tramite le chiavi di riconoscimento fornite da Hoffman *et al.* (1975), Lynn (1975) e Saglam & Sarieyyupoglu (2002).

RISULTATI

Esame anatomopatologico

I soggetti esaminati hanno mostrato uno stato di buona nutrizione. Le pinne, specialmente nei soggetti maschi, apparivano ben distese e integre. In alcuni soggetti era evidente la presenza di un modico esoftalmo bilaterale. Tutti i soggetti presentavano delle lesioni cutanee (Figura 1) rappresentate da:

- aree discromiche biancastre dove il muco appariva abbondante ed opaco;
- profonde ulcere cutanee non iperemiche con margini netti.

Tali lesioni si approfondivano nella muscolatura fino ad arrivare, in alcuni casi, agli elementi scheletrici sottostanti.

Le lesioni, delle dimensioni variabili da pochi millimetri ad un centimetro, erano localizzate prevalentemente sul dorso in prossimità della testa, più raramente nella regione ventrale o dei fianchi.

L'esame dei visceri interni non evidenziava lesioni macroscopiche.

Esame microscopico a fresco

L'osservazione microscopica del raschiato da branchie, cute integra e lesioni ulcerose ha messo in evidenza dalle aree cutanee lesionate una abbondante presenza di forme parassitarie protozoarie ciliate dotate di vistosi movimenti. I parassiti di forma ovoide-piriforme (Figure 2 e 3) caratterizzati da simmetria radiale e da dimensioni variabili (30-60 x 50-100 micrometri) presentavano numerose lunghe cilia mobili distribuite su tutto il corpo. Evidente era anche il classico movimento a spirale (a palla da rugby). E' da segnalare che numerose

forme parassitarie vitali erano ancora reperibili dopo 72 ore di conservazione dei pesci morti a temperatura di refrigerazione (5-6° C).



Figura 1 – *Poecilia reticulata*: ulcerazione cutanea.
Figure 1 – *Poecilia reticulata*: skin ulceration.

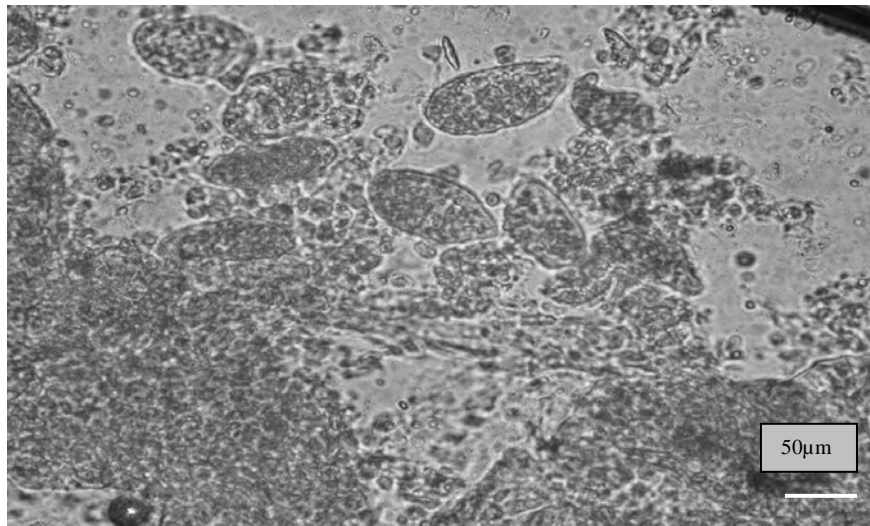


Figura 2 - *Tetrahymena* sp. da vetrino a fresco.
Figure 2 - *Tetrahymena* sp. from wet mount.

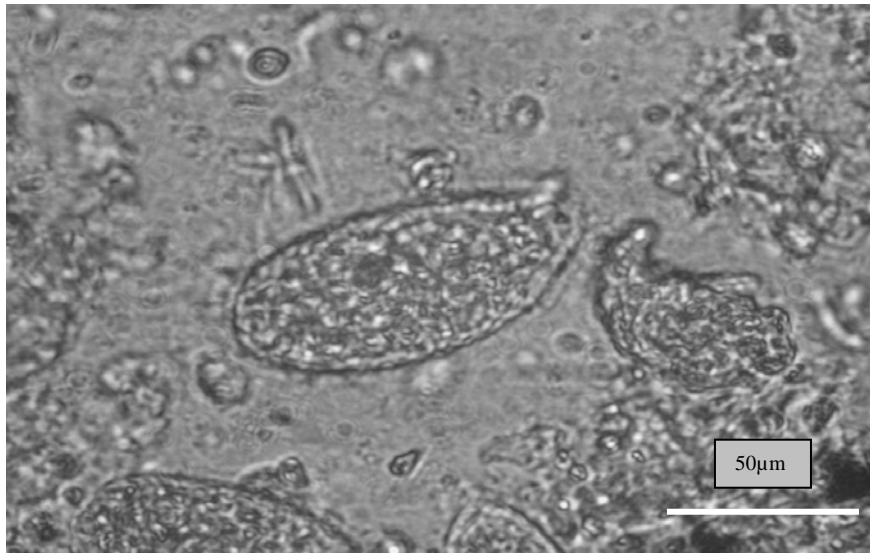


Figura 3 - *Tetrahymena sp.* da vetrino a fresco.
Figure 3 - *Tetrahymena sp.* from wet mount.

Esame microscopico con colorazione

Non ha evidenziato la presenza di strutture morfologiche batteriche riferibili a flavobatteri.

Esame colturale

Ha dato esito negativo per la ricerca di agenti batterici.

Esame istologico

Sul rivestimento cutaneo erano osservabili piccole vescicole e ulcere prive di reazione flogistica circostante. Nelle vescicole, nel sottocute e tra le fibre muscolari si osservavano gruppi di parassiti ovali, acidofili, circondati da parete ciliata (Figura 4). Il corpo parassitario era occupato da numerose piccole subunità acidofile e da una struttura rotondeggiante, basofila, più voluminosa, il macronucleo. Le fibre muscolari, dissociate, non mostravano degenerazioni (Figura 5). Più raramente, parassiti isolati, sono stati osservati nelle branchie e nei vasi ematici (Figura 6). Nei tessuti parassitati non era evidente alcuna reazione infiammatoria. Non si sono osservati aggregati batterici.

In base alle analisi di cui sopra, la causa della mortalità ha potuto essere attribuita con certezza ad una infezione acuta da ciliati istofagi appartenenti al genere *Tetrahymena*.

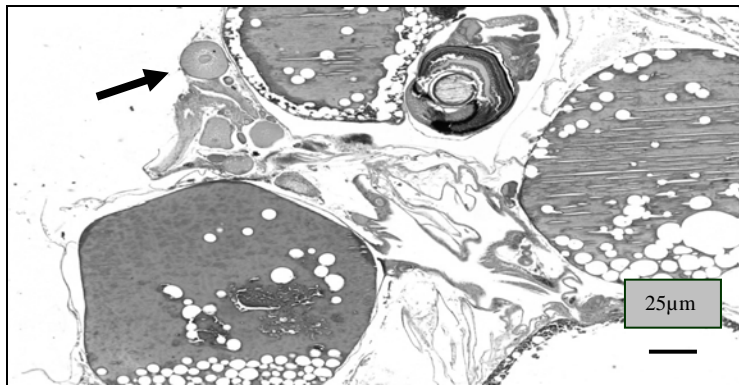


Figura 4 - *Tetrahymena* sp. nei tessuti cutanei e sottocutanei.
Figure 4 - Tetrahymena sp. in skin and subcutaneous tissues.

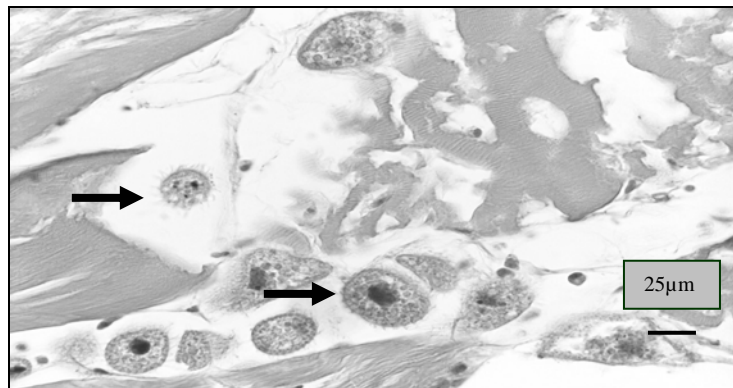


Figura 5 - *Tetrahymena* sp. nel tessuto muscolare.
Figure 5 - Tetrahymena sp. in muscle tissue.

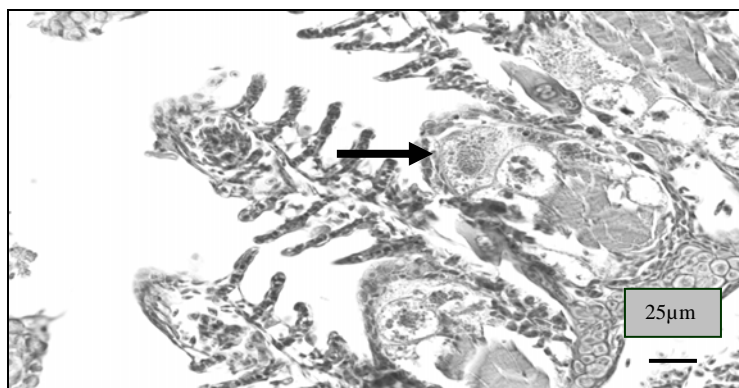


Figura 6 - *Tetrahymena* sp. nei tessuti branchiali.
Figure 6 - Tetrahymena sp. in gill tissue.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Le indagini condotte hanno permesso di individuare in tempi rapidi la causa di natura parassitaria della mortalità nella partita di guppy di recente importazione. La malattia ha avuto nel suo complesso un andamento rapido e di difficile gestione. Il proprietario, che aveva già intrapreso una terapia a base di tetracicline (bagno permanente) avendo sospettato un problema di natura batterica, è poi ricorso, sulla base della diagnosi di laboratorio, all'uso di sostanze disinfettanti, ma con scarsi risultati. La mortalità si è protratta per dieci giorni e ha raggiunto il valore complessivo del 60% dell'effettivo (centinaia di pesci). Tutti gli esemplari in cui sono comparse le lesioni ulcerose anche durante il trattamento sono comunque venuti a morte. Probabilmente un fattore che ha condizionato la severità delle lesioni e della mortalità osservate è stato lo stress da trasporto. L'applicazione delle buone prassi di profilassi diretta, presso le vasche di quarantena della rivendita ha permesso comunque la limitazione dell'infestazione alla sola partita di pesci in questione.

Solo un'attenta e scrupolosa selezione dei fornitori che siano in grado di garantire ottimali condizioni di trasporto e di standard sanitario degli allevamenti d'origine, unitamente ad una corretta quarantena, può permettere una limitazione dei danni economici e una riduzione della diffusione di questa malattia parassitaria.

Il problema diviene ancora più evidente se consideriamo la possibilità di diffusione di tale patogeno all'ittiofauna delle nostre acque pubbliche e dei nostri allevamenti.

RINGRAZIAMENTI

Si ringrazia per la preziosa collaborazione il Sig. Franzoni Marco dell'Associazione Naturalistica Acquariologica e Terrariologica (ANAT) di Treviglio (BG).

BIBLIOGRAFIA

Astrofsky K.M., Schech J.M., Sheppard B.J., Obenschain C.A., Chin A.M., Kacergis M.C., Laver E.R., Bartholomew J.L. & Fox J.G. (2002). High mortality due to *Tetrahymena* sp. infection in laboratory-maintained zebrafish. *Compar. Med.*, 52, 4: 363-367.

Edgerton B., O'Donoghue P., Wingfield M. & Owens L. (1996). Systemic infection of freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus* by hymenostome of the *Tetrahymena pyriformis* complex. *Dis. Aquat. Org.*, 27: 123-129.

Ferguson H.W., Hicks B.D., Lyn D.H., Ostlad V.E. & Bailey J. (1987). Cranial ulceration in Atlantic salmon *Salmo salar* associated with *Tetrahymena* sp. *Dis. Aquat. Org.*, 2: 191-195.

Hoffman G.L. Landolt M., Camper E., Coats D.W., Stokey I.L. & Burek J.D. (1975). A disease of freshwater fishes caused by *Tetrahymena corlissi* Thompson, 1955, and a key for identification of holotrich ciliates of freshwater fishes. *J. Parasitol.*, 61, 2: 217-223.

Imai S., Tsurimaki S., Goto E., Wakita K. & Hatai K. (2000). *Tetrahymena* infection in guppy, *Poecilia reticulata*. *Fish Pathol.*, 35, 2: 67-72.

Kim J.H., Hayward C.J., Joh S.J. & Heo G.J. (2002). Parasitic infections in live freshwater tropical fishes imported to Korea. *Dis. Aquat. Org.*, 52, 2: 169-173.

- Kozloff E.N. (1957). A species of *Tetrahymena* parasitic in the renal organ of the slug *Deroceros reticulatum*. *J. Protozool.*, 4: 75-79.
- Lim L.C., Dhert P. & Sorgeloos P. (2003). Recent developments and improvements in ornamental fish packaging systems for air transport. *Aquaculture Res.*, 34: 923-935.
- Lynn D.H. (1975). The life cycle of the histophagous ciliate *Tetrahymena corlissi* Thompson, 1955. *J. Protozool.*, 22, 2: 188-195.
- Lynn D.H., Gransden S.G., Wright A.-D.G. & Josephson G. (2000). Characterization of a new species of the ciliate *Tetrahymena* (Ciliophora: Oligohymenophorea) isolated from the urine of a dog: first report of *Tetrahymena* from a mammal. *Acta Protozool.*, 39: 289-294.
- Manfrin A., Rubini S., Caffara M., Volpin M., Alborali L. & Fioravanti M.L. (2002). Patologie batteriche e parassitarie in pesci ornamentali provenienti da paesi extracomunitari: risultati preliminari. *Boll. Soc. It. Patol. Ittica*, 33: 44-54.
- Nigrelli R.F., Jakowska S. & Padnos M. (1956). *Tetrahymena* as pathogenic epibiont in fishes and urodeles. *J. Protozool.*, 3, Suppl.: 10.
- Noga E.J. (1996). Fish disease. Diagnosis and treatment. *Mosby-Year Book, Inc., St. Louis, Missouri*: 104-105.
- Ponpornpisit A., Endo M. & Murata H. (2000). Experimental infections of a ciliate *Tetrahymena pyriformis* on ornamental fishes. *Fisheries Science*, 66: 1026-1031.
- Saglam N. & Sarieyyupoglu M. (2002). A study on *Tetrahymena pyriformis* (holotrichous) and *Epistylis sp.* (peritrichous) found on freshwater leech, *Nephelopsis obscura*. *Pakistan J. Biol. Sciences*, 5, 4: 497-498.
- Seaman G.R., Tosney T., Berglund R. & Goldberg G. (1972). Infectivity and recovery of *Tetrahymena pyriformis* strains from adult female cockroaches (*Periplaneta americana*). *J. Protozool.*, 19: 644-647.
- Speide C.C. (1954). The occurrence of amiconucleate *Tetrahymena* as facultative parasite in embryos of the catfish *Ameiurus*. *Biol. Bull.*, 115: 366.
- Strüder-Kypke M.C., Wright A.-D.G., Jerome C.A. & Lynn D.H. (2001). Parallel evolution of histophagy in ciliates of genus *Tetrahymena*. *BMC Evolutionary Biol.*, 1: 5.
- Thilakarathne I.D., Rajapaksha G., Hewakopara A., Rajapakse R.P. & Faizal A.C. (2003). Parasitic infections in freshwater ornamental fish in Sri Lanka. *Dis. Aquat. Org.*, 54, 2: 157-162.