

Πρώτη εμφάνιση μυκητίασης σε εκτρεφόμενα θαλασσινά ψάρια του είδους *Pagrus pagrus* (Linnaeus, 1758) (Φαγκρί) από *Exophiala* sp. στην Ελλάδα

Μάρκος Ν. Κολύγας¹, Ευγενία Γουρζιώτη¹, Φωτεινή Αθανασοπούλου¹

¹Εργαστήριο Ιχθυολογίας-Ιχθυοπαθολογίας, Τμήμα Κτηνιατρικής, Παν. Θεσσαλίας- kolygasmarkos@yahoo.gr

ABSTRACT

Markos N. Kolygas¹, Evgenia Gourzioti¹, Foteini Athanasopoulou¹: First incident of mycosis in marine cultured red porgy (*Pagrus pagrus* Linnaeus, 1758) caused by *Exophiala* sp. in Greece.

Exophiala sp. is an opportunistic fungal pathogen which infects marine teleosts worldwide. This is the first report of *Exophiala* infection in Greece causing moderate mortalities to cultured red porgy *Pagrus pagrus* (Linnaeus, 1758). Diseased *P. pagrus* showed bile distension and systemic fibrotic granulomatosis in target organs such as kidney, spleen and liver. Microbiological samples from these organs cultured in tryptic soy agar (TSA), Sabouraud dextrose agar (SDA) and potato dextrose agar (PDA)(21⁰C), indicated black pigmented hyphomycete colonies. Microscopically, septate hyphae were demonstrated with characteristic annelid morphology surrounded by hyaline unicellular conidia. Pathogen failed to grow after incubation at 37⁰C and/or salinity greater than 8‰. Taking into consideration the fact that antifungal drugs are not well studied in marine fish, potential severe marine mycoses could result in significant economic losses in Greece.

Keywords: Black Yeast, *Exophiala* sp., marine fungi

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι μυκητιάσεις σε εκτρεφόμενα ψάρια γλυκού νερού είναι συχνές και προκαλούν μεγάλες θνησιμότητες (Athanasopoulou *et al.* 1986). Στα θαλασσινά εκτρεφόμενα ψάρια οι μυκητιάσεις είναι σπάνιες και τέτοιες μολύνσεις συνήθως είναι δύσκολο να αντιμετωπιστούν και να εκριζωθούν από την εκτροφή. Τα τελευταία χρόνια μολύνσεις από *Exophiala* spp. έχουν αναφερθεί σε πολλούς θαλάσσιους τελεόστεους οργανισμούς όπως γλώσσα (Kurata *et al.* 2008), κοκκάλι (Munchan *et al.* 2009), μπακαλιάρο (Reuter *et al.* 2003, Gjessing *et al.* 2011) αλλά και σε χονδριχθύες (Marancik *et al.* 2011), ενώ στην Ελλάδα αυτή είναι η πρώτη αναφορά ως παθογόνο ψαριών.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

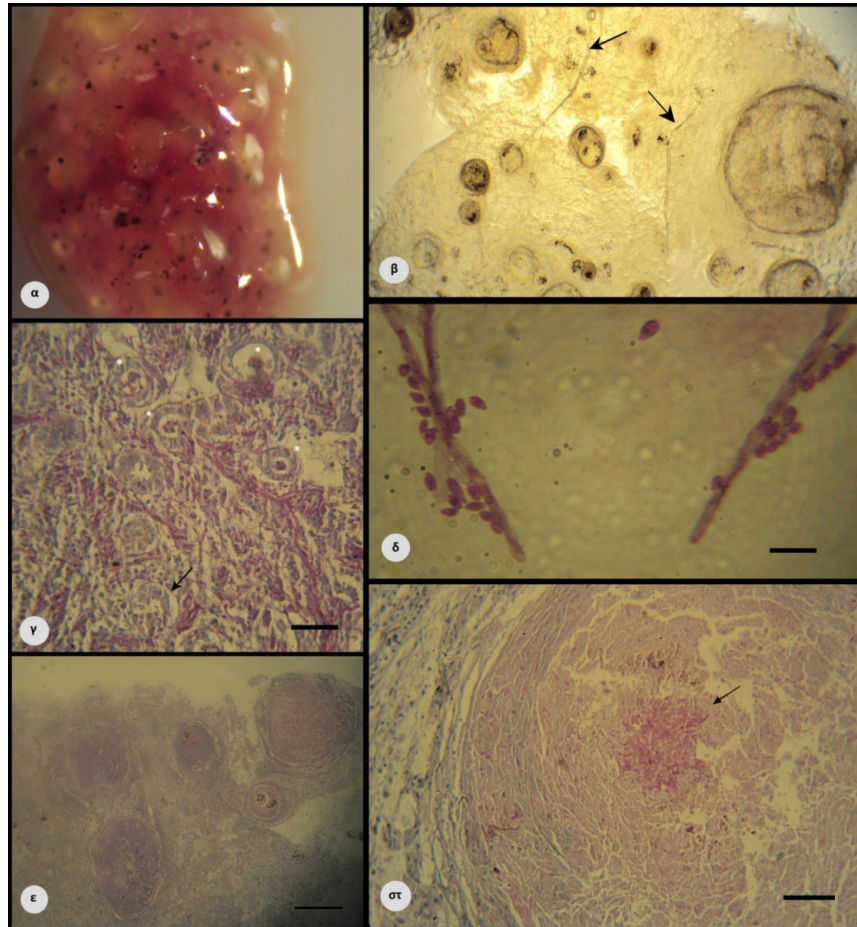
Τριάντα πέντε φαγκριά (*Pagrus pagrus*) που προέρχονταν από μονάδα εκτροφής ευρύαλων ειδών του Βορείου Αιγαίου μεταφέρθηκαν στις εγκαταστάσεις του εργαστηρίου Ιχθυολογίας και Ιχθυοπαθολογίας (Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας) και φιλοξενήθηκαν σε 2 ενυδρεία 250l με παροχή οξυγόνου. Τα ψάρια αποτελούσαν υποκείμενα δειγματοληψίας από ιχθυοκλωβό όπου εκτρέφονταν συνολικά 70.000 φαγκριά και τα οποία εμφάνιζαν συνεχιζόμενη θνησιμότητα της τάξης των 50-100 ψαριών/ημέρα. Τα ιχθύδια με μέσο βάρος 17g, εκτρέφονταν σε ιχθυοκλωβούς και προέρχονταν από ιχθυογεννητικό σταθμό της περιοχής. Σε όλα τα ψάρια διενεργήθηκαν μικροβιολογικές, παρασιτολογικές και ιστοπαθολογικές εξετάσεις.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Νεκροσκοπικά παρατηρήθηκε στη πλειονότητα των ψαριών, διογκωμένη χολή, κενός εντερικός σωλήνας με εστιακές αιμορραγικές αλλοιώσεις. Μετά από εξέταση νωπών επιχρισμάτων χολής και εντέρου εντοπίστηκαν μεγάλοι αριθμοί μυξοσποριδίων του γένους *Ceratomyxa*, και στα δύο όργανα. Όλα τα όργανα διατηρήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα

φορμόλης 10% για περαιτέρω ιστοπαθολογικές εξετάσεις με χρώση Giemsa και Αιματοξυλίνη-Εωσίνη.

Σε 5 άτομα, εκτός των προαναφερθέντων νεκροτομικών ευρημάτων, παρατηρήθηκε εκτεταμένη αναιμία, πλήρης αποχρωματισμός βραγχίων και οζίδια σε ήπαρ, σπλήνα και νεφρό (Εικ. 1α). Μετά από παρατήρηση νωπών επίχρισμα από αυτά τα όργανα εντοπίστηκαν πολυπληθείς υφές και σπόρια περίξ των οζιδίων (Εικ. 1β). Οι ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις σε αυτά τα όργανα ήταν σαφείς μετά από σύνθετη χρώση περιοδικού οξέος-Schiff's-Αιματοξυλίνης (PAS-H). Πιο συγκεκριμένα στους νεφρούς παρατηρήθηκε εκφύλιση των επιθηλιακών κυττάρων των ουροφόρων σωληναρίων και εξοίδηση αυτών, με τις υφές να διεισδύουν εντός των σωληναρίων αποδιοργανώνοντας τη λειτουργική δομή τους (Εικ. 1γ).



Εικ. 1: α) Νεφρός προσβεβλημένος από *Exophiala* sp με πολλαπλά οζίδια. β) Νωπό επίχρισμα νεφρού στο οποίο εντοπίζονται οζίδια και υφές του μύκητα (βέλη). γ) Ιστολογική τομή νεφρού με ευδιάκριτες υφές σε όλη την επιφάνεια, νεκρωτικό επιθήλιο ουροφόρων σωληναρίων (βέλος) με εναπόθεση άμορφου υλικού στον αυλό τους (*), χρώση PAS-H, μπάρα 50μm. δ) υφές και σπόρια του μύκητα, χρώση Gram, μπάρα 10μm. ε) Ινώδη κοκκιώματα σε τομή νεφρού, χρώση PAS-H, μπάρα 100μm. στ) Τομή ινώδους κοκκιώματος με υφές στο εσωτερικό του (βέλος), χρώση PAS-H, μπάρα 50μm.

Fig 1: α) Kidney infected with *Exophiala* sp. showing multiple nodules. β) squash mount with nodules and fungal hyphae (arrows). γ) kidney section presenting abundant hyphae, necrotic epithelium of urinary ductules (arrow) and deposition of amorphous substance within the lumen (*), PAS-H stain, bar 50μm. δ) Fungal hyphae and conidia, Gram stain, bar 10μm. ε) Fibrotic granulomas in kidney section, PAS-H stain, bar 100μm. στ) Granuloma section with hyphae at the center (arrow), PAS-H stain, bar 50μm.

Στο σπλήνα και στο ήπαρ εντοπίστηκαν πολλαπλά κοκκιώματα διαφόρου μεγέθους υποδεικνύοντας τη συστηματική έκταση της νόσου. Από αυτά τα τρία όργανα έγιναν μικροβιολογικές καλλιέργειες σε tryptic soy agar (TSA), Sabouraud dextrose agar (SDA) και potato dextrose agar (PDA) και επώαστηκαν στους 21^oC και 37^oC. Ενώ έγιναν και έτερες καλλιέργειες σε TSA-2%NaCl, PDA-2%NaCl και PDA-2%NaCl οι οποίες επώαστηκαν επίσης στους 21 και 37^oC.

Μετά από αυτά τα ευρήματα έγινε σύνθετη χρώση PAS-H και στα όργανα των προηγούμενων 30 ιχθύων για να εξετασθεί πιθανή ύπαρξη υφών ή/και σπόριων.

Οι μύκητες αναπτύχθηκαν με την ίδια ευκολία τόσο σε TSA, όσο και σε PDA και SDA ωστόσο στα αντίστοιχα θρεπτικά υποστρώματα με 2%NaCl παρουσίασαν μικρότερη ταχύτητα ανάπτυξης. Αλατότητα άνω του 5% στα υποστρώματα αποτελούσε περιοριστικό παράγοντα ανάπτυξης. Εκτός από τη διαφορά στο ρυθμό αύξησης εντοπίστηκαν και σημαντικές διαφοροποιήσεις ως προς τη μορφολογία του μύκητα. Πιο συγκεκριμένα στα θρεπτικά υποστρώματα χωρίς αλάτι οι υφές είχαν τη χαρακτηριστική ριζοειδή μορφολογία των υφομυκήτων (Εικ. 2α), ενώ σε θρεπτικά υποστρώματα με αλάτι οι αποικίες διαφοροποιούνταν και εμφάνιζαν μορφολογία ζυμών (yeast-like fungi) (Εικ. 2γ). Σε ότι αφορά το χρώμα του μύκητα επίσης εντοπίστηκαν μικρές διαφοροποιήσεις ανάλογα με την αλατότητα του υποστρώματος. Σε TSA, PDA και SDA χωρίς αλάτι ο μύκητας είναι καφέ-σκούρος στα κεντρικά και ενδότερα τμήματα του ενώ στη περιφέρεια του και εξωτερικά είναι υπόλευκος (Εικ. 2β). Αντίθετα αυτή η υπόλευκη περιφερειακή ωχρότητα δεν είναι ορατή σε αποικίες όπου καλλιεργούνται σε υποστρώματα με 2% NaCl (Εικ. 2γ). Τέλος, ο μύκητας δεν αναπτύχθηκε σε θερμοκρασία επώασης 37^oC.

Από τη μικροσκοπική παρατήρηση των υφών και των σπόριων προέκυψαν σημαντικά συμπεράσματα για τη μορφολογία και συνεπαγόμενα για τη ταυτοποίηση του μύκητα. Τα σπόρια εμφανίζονταν ελλειψοειδή και αμφίκουλα με μήκος 5-6μm και πλάτος 3μm (Εικ. 1δ), ενώ οι υφές φέρουν εγκάρσια διαφράγματα. Οι κύριες υφές παρουσίαζαν πάχος 5μm ενώ τα βλαστικά μυκήλια δεν ξεπερνούσαν σε πάχος τα 3μm. Τα κονίδια είχαν κυλινδρικό-διατείνων σχήμα με οξεία άκρα, στα οποία εντοπίζονταν αρκετά σπόρια (Εικ. 1δ).



Εικ. 2: α) Υφές 3 ημέρες μετά τη σπορά (PDA), β) Αποικία *Exophiala* sp. 30 ημέρες μετά τη σπορά (SDA), γ) 6 ημέρες μετά τη σπορά, διακρίνονται ζυμόμορφες αποικίες σε SDA-2% NaCl.

Fig 2: α) Hyphae 3 days after seeding (PDA), β) *Exophiala* sp. colony, 30 days after seeding, γ) 6 days after seeding black yeast like colonies are obvious on SDA-2% NaCl.

Από τα παραπάνω χαρακτηριστικά προκύπτει σαφώς πως ο μύκητας ανήκει στο γένος *Exophiala* (black yeast-like fungus) (Germain & Summerbell 2011). Παρά τη συστηματική εικόνα δεν παρατηρήθηκαν επιδερμικές αλλοιώσεις σε κανένα από τα ψάρια, γεγονός που συνάδει με τα ευρήματα των (Munchan *et al.* 2009), αλλά όχι με εκείνα των (Kurata *et al.* 2008).

Από τα 5 φαγκριά που εμφάνισαν οζίδια σε ήπαρ, σπλήνα και νεφρό, ιστολογικά έφεραν κοκκιώματα τα οποία και μετά από μικροσκοπική παρατήρηση, περιείχαν πολυάριθμους μύκητες στο εσωτερικό τους (Εικ. 1στ).

Μέσω ιστοπαθολογικής ανάλυσης των οργάνων των υπόλοιπων φαγκριών (30), με σύνθετη χρώση PAS-H από τα όργανα τους εντοπίστηκαν υφές μόνο στο εντερικό βλεννογόνο και στο περιεχόμενο του, στοιχείο το οποίο ίσως να αποτελεί ένδειξη για τη πιθανή οδό προσβολής του *Exophiala* sp. Στο παρόν περιστατικό η μόλυνση ήταν πιθανότατα ευκαιριακή εξαιτίας της ανοσοκαταστολής που είχε ήδη επέλθει από τη προϋπάρχουσα μυξοσποριδίαση.

Ωστόσο η παραπάνω μόλυνση είναι η πρώτη αναφορά μυκητίασης θαλάσσιων ειδών εντός του ελλαδικού χώρου από *Exophiala*. Είναι αναγκαία η περαιτέρω διερεύνηση του μύκητα σε μοριακό επίπεδο έτσι ώστε να προκύψουν πιθανοί συσχετισμοί με έτερα είδη μυκήτων. Οι αναφορές και τα στοιχεία σχετικά με την οικολογία και το πραγματικό μολυσματικό αποτύπωμα αυτού του μύκητα σε άλλους ιχθύες είναι ελλιπή, καθώς επίσης και έρευνες σχετικά με αποτελεσματικές αντιμυκητιακές ουσίες έναντι αυτού του γένους μυκήτων.

Η παρούσα έρευνα έχει συγχρηματοδοτηθεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο - ΕΚΤ) και από εθνικούς πόρους μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» του Εθνικού Στρατηγικού Πλαισίου Αναφοράς (ΕΣΠΑ) – Ερευνητικό Χρηματοδοτούμενο Έργο: Ηράκλειτος ΙΙ . Επένδυση στην κοινωνία της γνώσης μέσω του Ευρωπαϊκού Κοινωνικού Ταμείου.



ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Athanassopoulou F, Haralabidis S, Bourtzi- Hatzopoulou E (1986) Parasites and fungi of *Scomber japonicus colias* Gmelin 1789 from the North Aegean Sea. *Biologia Gallo-hellenica* 12: 217-228
- Germain GSt, Summerbell R (2011) Identifying Filamentous Fungi: A Clinical Laboratory Handbook, Star Publishing, Belmont, USA, p. 34-35, 171-172
- Gjessing MC, Davey M, Kvellestad A, Vralstad T (2011) *Exophiala angulospora* causes systemic inflammation in Atlantic cod *Gadus morhua*. *Diseases of Aquatic Organisms* 96(3): 209-19
- Kurata O, Munchan C, Wada S, Hatai K, Miyoshi Y, Fukuda Y (2008) Novel *Exophiala* infection involving ulcerative skin lesions in Japanese Flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fish Pathology* 43: 35 – 44
- Marancik DP, Berliner AL, Cavin JM, Clauss TM, Dove ADM, Sutton DA, Wickes BL, Camus AC (2011) Disseminated fungal infection in two species of captive sharks. *Journal of Zoo and Wildlife medicine* 4: 686-93
- Munchan C, Kurata O, Wada S, Hatai K, Sano A, Kamei K, Nakaoka N (2009) *Exophiala xenobiotica* infection in cultured striped jack *Pseudocaranx dentex* (Bloch & Schneider), in Japan. *Journal of Fish Diseases* 32: 893–900
- Reuter RE, Hutchinson W, Ham J, Davis S (2003). *Exophiala* sp. infection in captured King George whiting (*Sillaginodes punctata*). *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 23: 128 –134