

21. RICERCHE SPERIMENTALI SULL'ESOFTALMIA ITTICA E STUDIO DI UN PROTEO AFFINE AL GRUPPO DEL PROTEUS X.

I pesci commestibili presentano spesso un'affezione nota col nome di esoftalmia. Essendomi capitato un esemplare vivo affetto da questa malattia, ho voluto studiarla sperimentalmente anche per vedere se i pesci così malati potessero o meno costituire un pericolo se destinati all'alimentazione umana.

Una cernia (*Epinephelus* sp.) — pescata nello stretto di Messina e conservata viva in un acquario della Stazione idrobiologica di Messina stessa — presentava un forte esoftalmo dell'occhio destro (fig. 1 e 2).

Interessato dal fatto, volli studiarlo specie per cercare di individuare l'etiologia dell'affezione e vedere se le conclusioni a cui era giunto il Terni ⁽¹⁾ nei suoi studi sull'esoftalmia epizootica dei pesci erano attendibili o, quanto meno, applicabili anche ai pesci marini.

L'esoftalmia epizootica è una malattia infettiva riscontrabile in diverse specie di pesci e caratterizzata da un esoftalmo più o meno accentuato di un occhio e talvolta di tutti e due, accompagnata da inappetenza e fotobia pronunciata, per cui il pesce si ripara nei punti più oscuri; e da variazioni della tinta, imbrunimento della cute, evidente soprattutto nei Salmonidi. A questi sintomi debbesi aggiungere: rigonfiamento quasi costante dell'addome e anemia accentuata delle branchie e dei visceri.

Anatomopatologicamente i pesci d'acqua dolce affetti da esoftalmia epizootica presentano, subito dopo la loro morte, macchie bianche sulla cute e, più tardi, la comparsa di una tinta bruna uniforme che appare con la rigidità. Nella cavità peritoneale si ha un versamento sieroso che è la causa della distensione dell'addome. I visceri si presentano apparentemente normali, ma profondamente anemici. In alcuni casi più gravi si nota la degenerazione grassa più o meno marcata del fegato, maggiore pigmentazione del parenchima renale, presenza di feci diarroiche nell'intestino, mentre lo stomaco è costantemente vuoto.

Nella capsula di Tenone dell'occhio si ha un versamento sieroso da cui origina la marcatissima protrusione dell'occhio in avanti e in alto. Si

tratterebbe, quindi, come fa notare il Terni, di un esoftalmo vero e non di un semplice buftalmo.

I disturbi della circolazione cagionata dalla tensione prodotta dal versamento sieroso retrobulbare provocano alterazioni in tutte le parti dell'occhio: si può avere, così, un aumento del vitreo e dell'umor acqueo; lesioni corneali, ulcerazioni, perforazioni e lesioni della parte interna dell'occhio, lesioni che conducono alla perdita completa dell'occhio stesso.

Accanto all'esoftalmo si ha certe volte una deviazione della mandibola per infiltrazione sierosa che dalla cavità orbitaria si fa strada lungo l'aponeurosi del massetere, o per versamento formatosi in una delle cavità articolari; si finisce, così, per avere una deformità permanente della mandibola che rimane deviata da un lato e sporgente in avanti oltre il labbro superiore.

Secondo il Terni l'agente etiologico della malattia sarebbe un bacillo Gram negativo, fondente la gelatina, formante su agar una massa mucosa e filante, e al quale egli impose il nome di *Bacillus collogenes*.

Questo germe vivrebbe soltanto nell'intestino dei pesci — dove bisognerebbe andarlo a cercare per coltivarlo — e di là agirebbe a distanza per mezzo di prodotti tossici solubili.

Questo tipo di esoftalmia epizootica è stata riscontrata in tutti i Salmonidi e poi nella *Tinca vulgaris*, nello *Squalius cephalus*, nella *Perca fluviatilis*, nel *Carassius auratus*, nel *Pagellus erythrinus*, nel *Serranus scriba*, nel *Serranus cabrilla*, nello *Smarius vulgaris* e nel *Mullus barbatus*.

Nel caso da me osservato, la Cernia non presentava che un importante esoftalmo vero causato da versamento sieroso nella capsula di Tenone con protrusione di tutto il globo oculare e distensione delle parti cutanee viciniori.

Il colorito generale della cute non presentava alterazioni di sorta. Il volume dell'addome era anch'esso normale e normali erano anche le branchie e gli altri organi interni della cernia autopsiata.

L'affezione sembrava, quindi, essere localizzata esclusivamente a un occhio senza generalizzazione morbosa.

Approfittando della notevole resistenza vitale delle cernie, praticai l'autopsia quando il pesce era ancora vivo compiendo nello stesso tempo analisi batteriologiche: praticai una emocultura, prelevando il sangue dal cuore ancora pulsante, e delle culture dal fegato e dal contenuto intestinale al fine di isolare quel *Bacillus collogenes* descritto dal Terni.

Dirò subito come dall'intestino isolai numerose specie di germi, dal fegato tre, mentre dal sangue ne isolai uno solo.

Ottenuti tutti questi microbi in cultura pura, cominciai — a titolo di orientamento e di selezione e ciò prima ancora di compiere su di essi ricerche di classificazione batteriologica — a studiarne la patogenicità sui pesci. Non potendo disporre di pesci marini ed avendo a disposizione soltanto vivai per pesci d'acqua dolce, inoculai i germi isolati a carpe galiziane di media grandezza.

Di tutti i germi isolati potei constatare come nessuno di quelli di origine intestinale — fra cui alcuni bellissimi cromogeni — fossero comunque patogeni per la carpa, mentre uno dei germi isolati dal fegato e quello isolato dal sangue fossero realmente micidiali per le carpe.

Da ricerche comparative successivamente eseguite sui due germi patogeni isolati potei concludere come essi fossero identici, come si trattasse, cioè, di una sola specie e, quindi, dello stesso germe.

La mia attenzione si polarizzò, così, su questo unico germe patogeno isolato e con esso continuai a compiere le mie ricerche sperimentali.

Dirò subito, tuttavia, che nessuno degli altri germi isolati presentò una qualche rassomiglianza col *Bacillus collogenes* del Terni.

Prima di riferire sulle inoculazioni sperimentali praticate, mi sembra opportuno intrattenermi sul germe isolato.

Morfologia. — Si tratta di un microbo estremamente polimorfo che ora presenta l'aspetto di un tipico bastoncello, ora quello di un coccobacillo, ora quello di un flessuoso e lungo filamento; isolato, a coppie, a catene, a gruppetti, è mobilissimo per numerose ciglia ondulate peritriche rilevabili soltanto con le apposite colorazioni (fig. 3).

Non produce spore; non prende il Gram; si colora facilmente con tutte le comuni sostanze coloranti.

Culture. — Cresce facilmente su tutti i terreni sia a temperatura ambiente che a 37°; è essenzialmente aerobio, ma vegeta pure in anaerobiosi. Nelle culture si ha odore putrido e in quelle vecchie odore di corno bruciato.

In *brodo* si ha intorbidamento e leggero velo ad anello aderente alle pareti.

In *agar* si ha rapido accrescimento e invasione di tutta la superficie, sì che non si riescono ad ottenere colonie isolate. Il ceppo fu ottenuto in cultura pura il 2 giugno e a tutt'oggi (30 dicembre), malgrado i ripetuti

tissimi passaggi e le estreme diluizioni praticate, non sono riuscito a vincere questa capacità espansiva e invadente del germe e ad ottenere colonie isolate.

Le patine su agar sono trasparenti con riflessi biancastri.

La *gelatina* viene fusa in superficie e lungo il canale di innesto; a volte — come conseguenza della fusione lungo il canale — si formano piccole concamerazioni che danno all'insieme l'aspetto di una fluidificazione a grappolo (fig. 4).

Su *patata* l'accrescimento si può considerare nullo; su *patata glicerinata*, invece, si ha un accrescimento gracile, a velo, grigiastro.

In *bile* si ha sviluppo e intorbidamento.

Le culture resistono più mesi all'invecchiamento.

Azioni biochimiche. — Il *latte* viene coagulato in un paio di giorni con separazione del siero; il coagulo si dissolve successivamente per peptonizzazione.

Anche il *siero* coagulato viene disciolto e così l'*albume d'uovo*, sebbene leggermente.

In presenza di peptone il germe produce indolo: le reazioni di Legal-Weil e di Solkowsky sono riuscite infatti positive; la reazione di Solkowsky senza aggiunta di nitrito potassico è riuscita, invece, negativa.

In terreni al *rosso neutro* si ha fluorescenza e in quello all'*acetato neutro di piombo* si ha annerimento.

Numerosi *zuccheri* vengono attaccati con produzione di acidi e gas e precisamente: glucosio, galattosio, xilosio, saccarosio, maltosio, salicina e glicerina (solo acidificazione).

Non vengono, invece, attaccati i seguenti: eritrite, adonite, sorbite, dulcite, isodulcite, mannite, arabinosio, fruttosio, inosite, lattosio, raffinossio, amido, destrina, inulina, glicogeno.

Il germe, infine, non è emolitico.

Per le proprietà fermentative sugli zuccheri e secondo la recentissima chiave di Yale ⁽²⁾ il germe da me isolato, fermentando il saccarosio con produzione di acido e gas, non fermentando la mannite ma producendo acido e gas dal maltosio, dovrebbe essere considerato come un *Proteus vulgaris* Hauser.

La chiave fornita dallo Yale per la diagnosi delle specie del genere *Proteus* è, infatti, la seguente:



Fig. 1 - Cernia con esoftalmo destro.

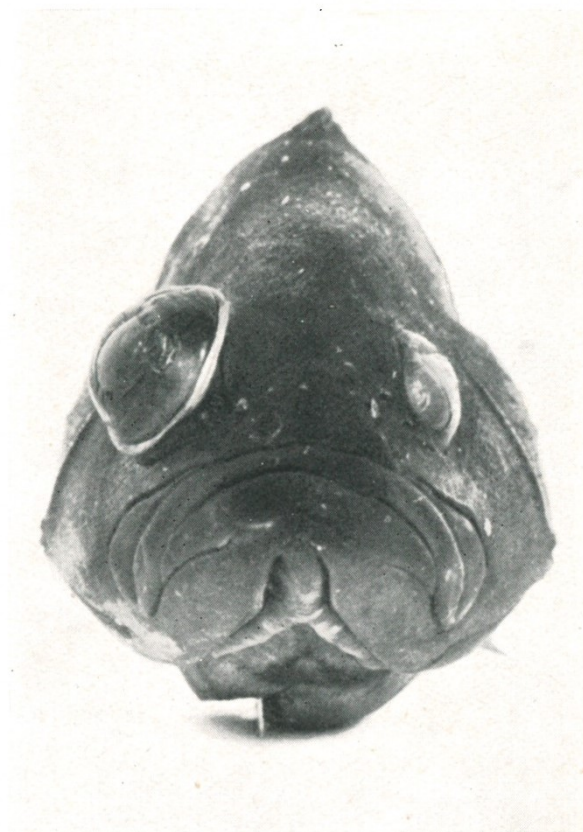


Fig. 2 - Cernia con esoftalmo destro.

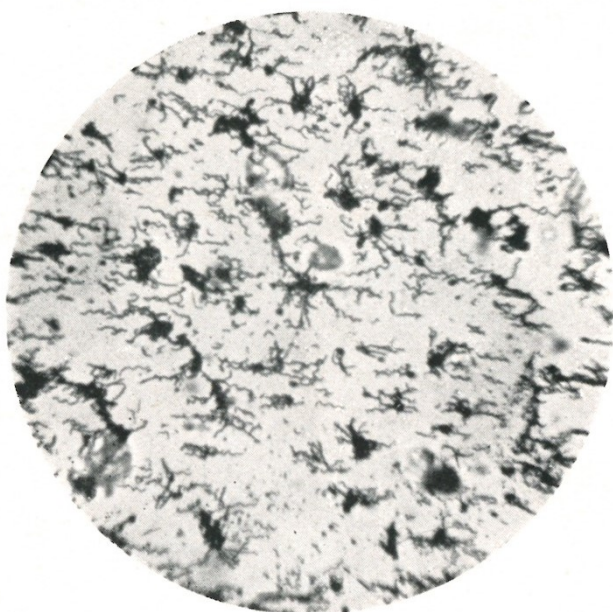


Fig. 3 - Proteo con ciglia colorate.

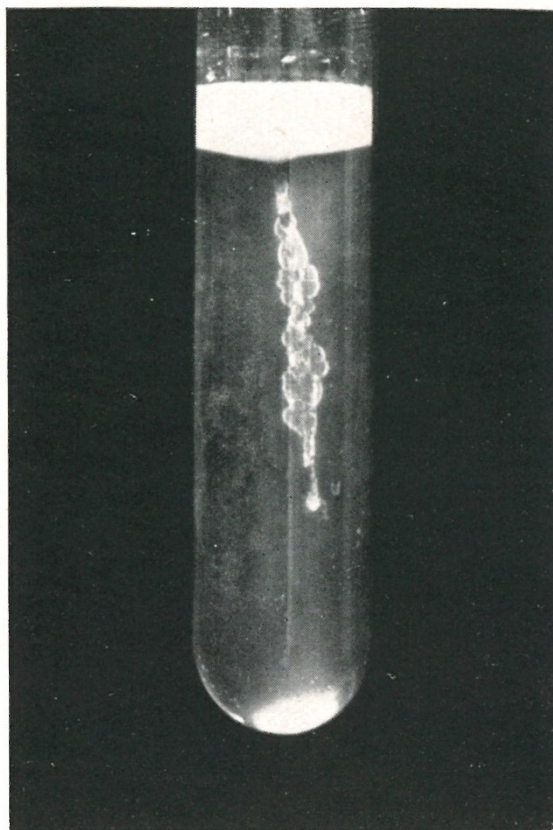


Fig. 4 - Cultura in gelatina: fluidificazione superficiale e a grappolo lungo la linea di innesto.

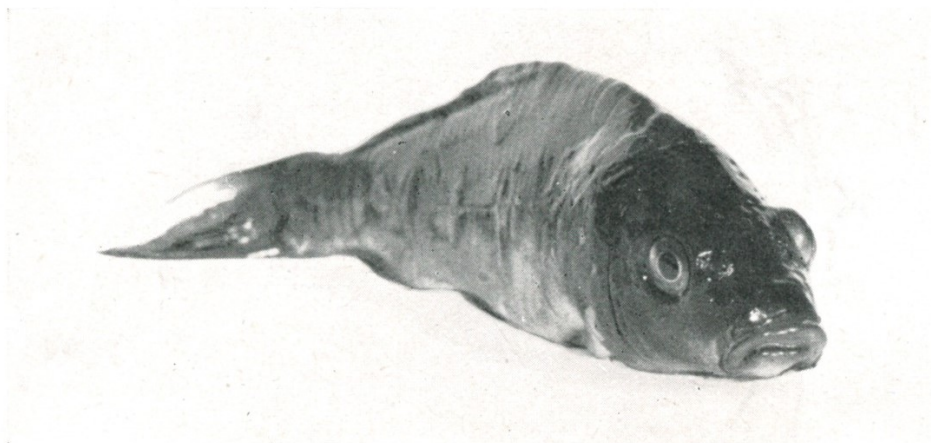


Fig. 5 - Carpa con esoftalmo sinistro sperimentale.

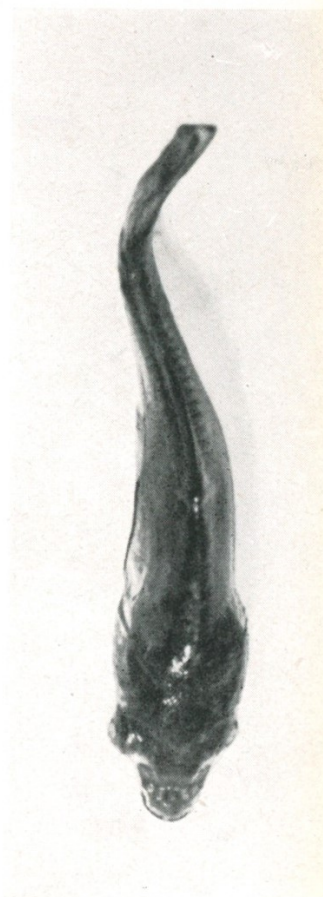


Fig. 6 - Carpa con esoftalmo destro sperimentale.

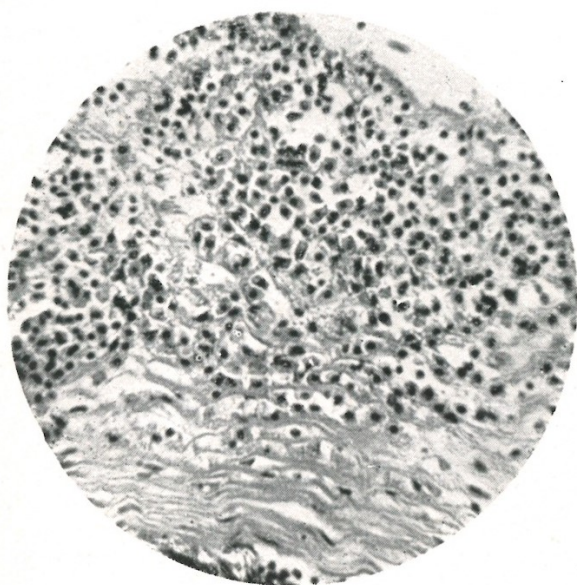


Fig. 7 - Emorragie infracutanee in una carpa.

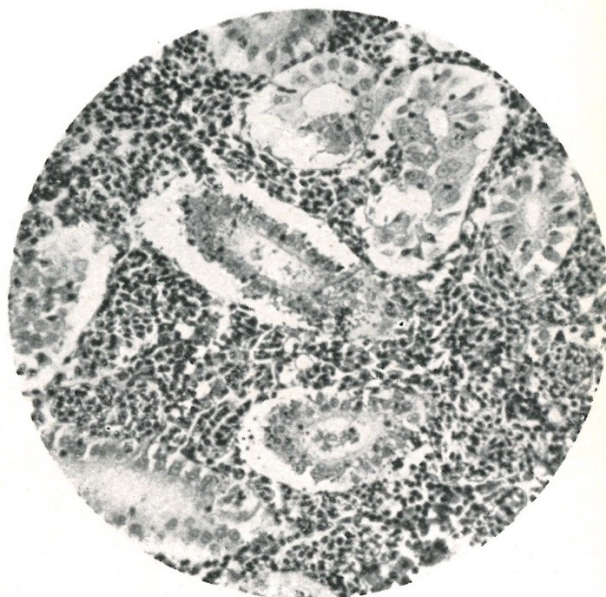


Fig. 8 - Emorragie tra i tubuli renali di una carpa.

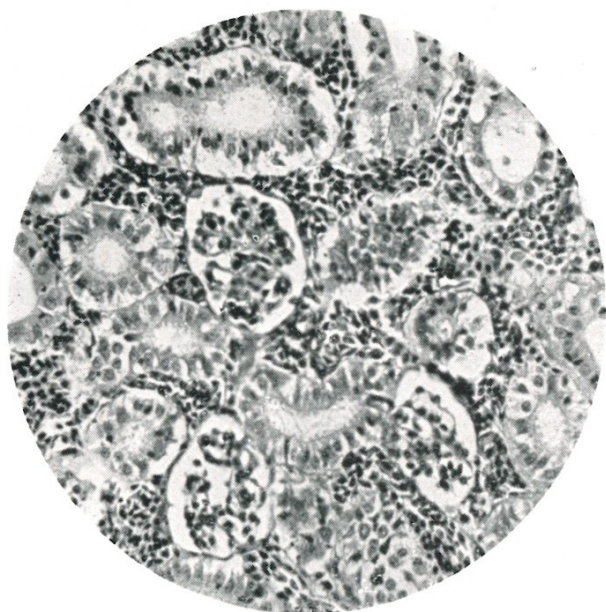


Fig. 9 - Emorragie peri e intraglomerulari in una carpa.

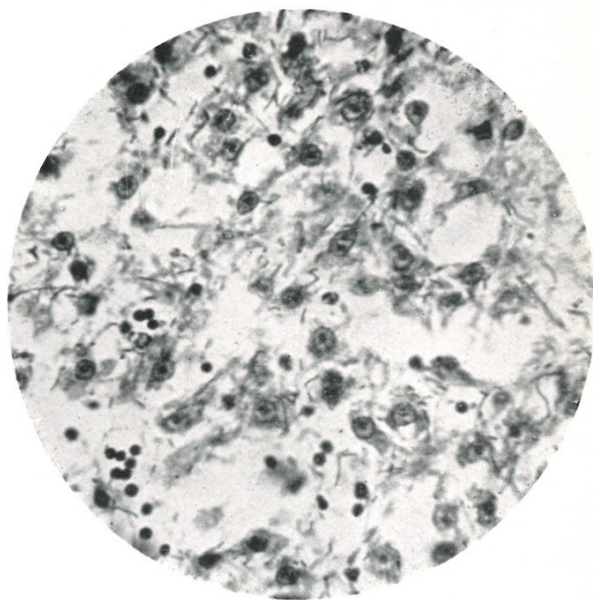


Fig. 10 - Protei sparsi tra le cellule epatiche di una carpa.

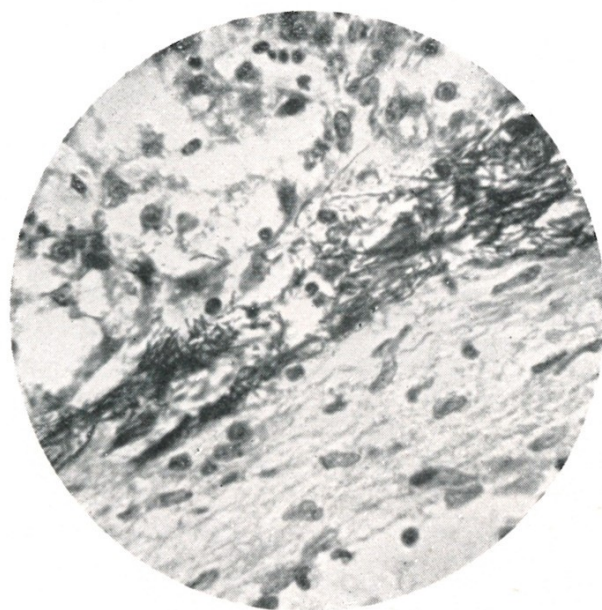


Fig. 11 - Ammassi di protei nel fegato di una carpa.



Emorragie cutanee in carpe inoculate sperimentalmente col proteo isolato dalla cernia esoftalmica.

I. - Acido e gas dal saccarosio:

A) Nessuna azione sulla mannite:

- | | |
|---------------------------------|-----------------------------|
| 1) Acido e gas dal maltosio: | 1. <i>Proteus vulgaris</i> |
| 2) Nessuna azione sul maltosio: | 2. <i>Proteus mirabilis</i> |

B) Acido e gas dalla mannite:

- | |
|-------------------------------|
| 3. <i>Proteus hydrophilus</i> |
| 4. <i>Proteus ichthyosmus</i> |

II. - Nessuna azione sul saccarosio:

A) Liquefazione della gelatina:

- | | |
|-----------------------------------|------------------------------|
| 1) Nessuna azione sul galattosio: | 5. <i>Proteus americanus</i> |
| 2) Acido e gas dal galattosio: | 6. <i>Proteus ammoniae</i> |

B) Gelatina non liquefatta:

- | | |
|----------------------------------|----------------------------------|
| 1) Acido e gas dalla mannite: | 7. <i>Proteus pseudovaleriei</i> |
| 2) Nessuna azione sulla mannite: | 8. <i>Proteus Morganii</i> |

Concluso trattarsi di un *Proteus vulgaris*, ho voluto infine cimentarlo con alcuni sieri di dermatofoso fatti appositamente venire per via aerea dall'Istituto per la profilassi e lo studio delle Rickettsiosi di Addis-Abeba e precisamente con quattro sieri che all'origine agglutinavano il *Proteus* X₁₉ rispettivamente al titolo di 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200, e che saggiati con vari ceppi di *Proteus* X davano agglutinazione positiva (con un ceppo conservato nell'Istituto di Sanità si ebbe agglutinazione a un titolo superiore a quello di origine) mentre non la davano affatto con vari ceppi di *Proteus* non del gruppo X e con un ceppo di *Proteus* che un tempo era agglutinato dai sieri di dermatofoso.

Con mia grande meraviglia il ceppo di *Proteus* da me isolato dalla Cernia veniva agglutinato dal siero dei dermatofosi e precisamente da due al titolo di 1:50, da uno al titolo di 1:70 e dall'ultimo al titolo di 1:120.

Il *Proteus* in questione si avvicinava dunque — oltre che per le sue capacità fermentative (produzione di acido e gas dal maltosio) — anche per le sue caratteristiche sierologiche al gruppo dei *Proteus* X.

Le constatazioni strane non si arrestarono qui: potei infatti constatare che il *Proteus* in questione oltre ad essere sperimentalmente patogeno per gli animali a sangue freddo era micidiale anche per i topi, le cavie e i conigli.

Inoculazioni sperimentali. — Con il germe isolato cominciai col praticare inoculazioni a carpe galiziane. Iniettai, così, per via parenterale — sottocute o nella cavità addominale — quantità varianti di brodocultura di 24 ore: da una goccia a poco meno di mezzo centimetro cubo. Il germe si mostrò virulentissimo, tanto che tutti i pesci inoculati andarono a morte in uno spazio variante tra le 24 e le 48 ore.

Caratteristica la sintomatologia che tutti i pesci trattati presentavano: un intenso arrossamento a chiazze della superficie cutanea (tav. I, fig. 1), ivi compresa la testa, la coda e le pinne (tav. I, fig. 2).

Per poter più a lungo seguire i pesci inoculati, diluii al centesimo una brodocultura di 24 ore e ne inoculai per via parenterale una goccia a un altro lotto di carpe galiziane.

Alcune di queste morirono in breve tempo e con la stessa sintomatologia ora descritta; alcune altre, invece, sopravvissero più a lungo sino a che in settima e ottava giornata cominciarono a presentare un esoftalmo unilaterale (figg. 5 e 6) non accompagnato nè da edemi nè da ringonfiamento dell'addome e tanto meno da anemia delle branchie e dei visceri, poichè in questi esemplari l'affezione decorse con tendenza emorragica. I pesci inoculati e nei quali la malattia non decorse in maniera acuta, deperirono notevolmente, rallentarono sempre più i loro movimenti e finirono col morire tutti lentamente. In alcuni le chiazze rosse finivano però collo scomparire.

Le lesioni più caratteristiche riscontrate furono — all'esame istologico — emorragie infra e sottocutanee (fig. 7), emorragie multiple nel parenchima renale (fig. 8) accompagnate da importanti lesioni dei tubuli e dei glomeruli (fig. 9); degenerazione del fegato il quale, in alcuni punti, era letteralmente invaso dai protei inoculati che si trovavano isolati e sparsi tra cellula e cellula (fig. 10) o addirittura in ammassi imponenti (fig. 11).

Quanto all'occhio esoftalmico, tutte le membrane si mostrano tese, assottigliate, scollate, lacerate.

Tentativi di inoculazione dei germi per via orale e di contaminazione dell'acqua in cui le carpe vivevano rimasero senza risultato.

Volli, infine, saggiare la patogenicità del germe su animali a sangue caldo e inoculai così sottocute e per via parenterale topini, ratti, cavie e conigli (questi ultimi anche per via endovenosa). Orbene il germe si mo-

strò patogeno per i topini, per le cavie e per i conigli, innocuo per i ratti. In tutti gli animali trattati si ebbe una violenta setticemia — in tutti i casi si potè isolare il germe dall'emocultura — e morte in meno di 24 ore con scarse lesioni anatomopatologiche se si toglie una modica congestione dei visceri e qualche filamento di fibrina presente nella cavità addominale.

Due conigli — su sei — e due cavie — su dieci — inoculate per via sottocutanea sopravvissero senza presentare ascessi putridi nei punti di inoculazione, ma un semplice indurimento a cordone. Nei primi tre giorni gli animali, specie i conigli, si mostrarono abbattutissimi e rifiutarono il cibo. In seguito, però, ripresero.

DISCUSSIONE.

Da quanto esposto risulta, dunque, che da una cernia pescata nello stretto di Messina e affetta da esoftalmo fu isolato un *Proteo* che per le sue caratteristiche culturali, fermentative e sierologiche si avvicina al gruppo del *Proteus vulgaris* e particolarmente a quello del *Proteus X*. Con questo *Proteo* è stato possibile riprodurre sperimentalmente nelle carpe una esoftalmia (accompagnata da altre manifestazioni morbose generali a carattere emorragico). Il *Proteus* isolato, dunque, deve ritenersi come l'agente dell'esoftalmia riscontrata nella Cernia.

Le conclusioni a cui io sono giunto attraverso le esposte ricerche non collimano con quelle del Terni che attribuiva, come abbiamo visto, la genesi dell'esoftalmia dei pesci a un *Bacillus collogenes* da lui isolato dal contenuto intestinale degli animali affetti.

Ciò porta alla considerazione che l'esoftalmia dei pesci non è una entità morbosa a se stante, ma più che altro un sintoma comune a differenti affezioni.

Nei riguardi del *Proteus* interessante è stato il fatto che un germe isolato da un pesce marino si è dimostrato patogeno anche per i pesci d'acqua dolce e, non solo, ma anche per i mammiferi come il topo, la cavia e il coniglio.

Ancora più eccezionale il fatto che il germe in questione si è dimostrato affine — dal punto di vista fermentativo — al gruppo del *Proteus X*, tanto affine da essere agglutinato — sia pure a basso titolo — dal siero di dermatofosi.

Dal punto di vista dell'alibilità, si deve concludere — per l'insieme dei fatti su esposti — che i pesci affetti da esoftalmia non sono adatti al consumo alimentare, ma debbono venire sequestrati e distrutti.

RIASSUNTO

Da una Cernia affetta da esoftalmo e pescata nello stretto di Messina è stato isolato dal sangue in cultura pura e dal fegato in subculture un germe che per le sue caratteristiche morfologiche, culturali e biochimiche si è dimostrato essere un *Proteus vulgaris* Hauser avvicinandosi al gruppo del *Proteus* X e agglutinabile a basso titolo dal siero di dermatofosi.

Detto germe, oltre ad essere patogeno per i pesci (anche d'acqua dolce) — nei quali è stato possibile riprodurre sperimentalmente l'esoftalmo, oltre a manifestazioni emorragiche cutanee e degli organi interni — si è dimostrato patogeno per gli animali a sangue caldo e particolarmente per i topini, le cavia e i conigli.

SUMMARIUM

Cum Acharna exophthalmo adfecto in freto Siculo capta esset, e sanguine illius in cultura pura, ex iecinore in subcultura germen quoddam segregatum est, quod morphologicis culturalibus biochymicis characteribus manifesto esse apparet unus *Proteus vulgaris* Hauser, qui et genere propinquus est Proteorum X, et dermatyphosorum sero facillime agglutinatur.

Id germen pathogenes est piscibus, tam marinis quam lacustribus et fluviatilibus (in quibus omnibus exophthalmus experimentis factum est ut gigneretur, et praesentiae haemorrhagicae cum cutis tum interiorum organorum concitatae sunt); pathogenes etiam animalibus sanguine calido praeditis, praecipue vero musculis et caviis et cuniculis.

Roma. — Istituto di Sanità Pubblica - Laboratorio di Batteriologia.

BIBLIOGRAFIA

(¹) TERNI C., « Epizootische Exophthalmie der Fische », Centrbl. Bakt. Abt. Ref., 39, 529 (1907).

(²) YALE M. W., « Proteus » in Bergey's Manual of determinative Bacteriology, Londra, 1939, pag. 430.
