



ATTI DEL XIII CONVEGNO NAZIONALE S.I.P.I.



26-28 Ottobre 2006
Abano Terme (PD)

ATTI DEL
XIII CONVEGNO NAZIONALE S.I.P.I.
Società Italiana di Patologia Ittica
26-28 ottobre 2006
Abano Terme (PD)

Sponsor del XIII Convegno S.I.P.I.



PROGRAMMA

XIII CONVEGNO NAZIONALE S.I.P.I. Società Italiana di Patologia Ittica



26-28 ottobre 2006
Abano Terme (PD)
Sala Convegni Hotel Terme Mioni Pezzato

GIOVEDÌ 26 OTTOBRE 2006

ORE 09.30-10.00 REGISTRAZIONE DEI PARTECIPANTI ED ISCRIZIONE AL CONVEGNO

ORE 10.00-10.15 APERTURA DEI LAVORI
Saluto del Presidente della S.I.P.I. e delle Autorità locali

Ore 10.15-11.30 **COMUNICAZIONI SCIENTIFICHE - I SESSIONE**
Moderatore Dott. Giuseppe Bovo

PREARO M., DELLEPIANE M., ARSIENI P., BRUNETTI R., GIANOLA C., ERCOLINI C., PISTONE G.

Validazione degli esami ittiopatologici secondo la normativa vigente: approccio iniziale

CIULLI S., GALLETI E., DAL POZZO F., SCAGLIARINI A.

Effetto inibitorio dell'EICAR sulla replicazione di Betanodavirus

BERALDO P., DE NIGRIS G., ROGATO F., GALEOTTI M.

Riscontro istologico e immunoistochimico di Encefaloretinopatia virale in larve di orata (*Sparus aurata* L. 1758)

MOSCA F., CALZETTA A., NARCISI V., PENNISI L., GIOIA L., TISCAR P.G.

Studio sui meccanismi immunitari di *Chamelea gallina* (L. 1758)

NARCISI V., CALZETTA A., MOSCA F., TISCAR P.G.

Variazioni dello stato di benessere di *Mytilus galloprovincialis* (LMK, 1819) in condizioni di stoccaggio

Ore 11.30-11.45 **COFFEE BREAK**

Ore 11.45-13.00 **COMUNICAZIONI SCIENTIFICHE - II SESSIONE**
Moderatore Prof. Pietro Giorgio Tiscar

CESCHIA G., SGRO L., CAPELLI G., ZENTILIN A., TAFUR R.R., SELLO M.
Studio della Perkinsosi nella vongola filippina (*Ruditapes philippinarum*) allevata nella Laguna di Marano (Nord Adriatico)

CULURGIONI J., D'AMICO V., DE MURTAS R., CANESTRI TROTTI G., FIGUS V.
Two-years monitoring on parasite infections of commercial bivalves from St. Gilla Lagoon (Sardinia, South Western Mediterranean)

FENZI G.A., SPIGA B., SALATI F.
Prove di trattamento dell'infestazione da *Polydora ciliata* in *Crassostrea gigas*

NARDINI G., BIELLI M., SCARAVELLI D., VIGNOLI M.
Gestione veterinaria nel recupero di tartarughe marine (*Caretta caretta*)

MAGI G.E., DI CICCIO E., RENZONI G., ROSSI G.
Un caso di carcinoma intestinale in killifish africano (*Fundulopanchax sjostedti* L.)

Ore 13.00-14.30 **Pausa Pranzo**

Ore 14.30-15.00 **PREMIAZIONE TESI – Proclamazione del vincitore del premio S.I.P.I. per la miglior tesi su argomenti di Ittiopatologia**
Dott. Marino Prearo
Responsabile scientifico di "ITTIOPATOLOGIA"

Ore 15.00-16.15 **COMUNICAZIONI SCIENTIFICHE - III SESSIONE**
Moderatore Prof. Giorgio Canestri Trotti

PALADINI G., GUSTINELLI A., DI CAVE D., BERALDO P., MOSCATO M., FIORAVANTI M.L., SHINN A.P.
Girodattilosi in orate (*Sparus aurata*) allevate nel Mar Adriatico

GUSTINELLI A., INVERNIZZI S., ROMANÒ C., FIORAVANTI M.L.
Plerocercosi da *Diphyllobothrium latum* (Cestoda, Pseudophyllidea) nel lago di Como: aggiornamenti epidemiologici.

CASTIGLIONE F., CUSIMANO M., GUSTINELLI A., FIORAVANTI M.L., VICARI D., FERRANTELLI V.

Reperti parassitari in elasmobranchi del Golfo di Palermo

CULURGIONI J., D'AMICO V., COLUCCIA E., MULAS A., FIGUS V.

Metazoan parasites of conger eel (*Conger conger* L.) from Sardinian waters (Italy)

GUSTINELLI A., AGNETTI F., LATINI M., GHITTINO C., LOVAGLIO G., NATALI M., FIORAVANTI M.L.

Nuovi dati sulla Opistorchiasi in Italia

Ore 16.15-16.30

COFFEE BREAK

Ore 16.30-18.00

COMUNICAZIONI SCIENTIFICHE - IV SESSIONE

Moderatore Dott.ssa Paola Beraldo

CHERCHI S., CAPPUCCINELLI R., ANGELUCCI G., LAI M.G., GIAGONI A., ALBORALI L., SALATI F.

Patologie ed allevamento dell'ombrina boccardoro, *Argyrosomus regius* Asso 1801

FLORIO D., BOMBARDINI C., CAFFARA M., FIORAVANTI M.L., QUAGLIO F., FICHEL L.

Osservazioni sanitarie in Syngnathidae stabulati in cattività

QUAGLIO F., GALUPPI R., CAPOVILLA P., SANTORO D., BONOLI C., MARCER F., TAMPIERI M.P.

Infezioni da Saprolegniaceae in gamberi di fiume *Austropotamobius pallipes* complex in un allevamento sperimentale del Nord Italia

ELIA A.C., DÖRR A.J.M., ABETE M.C., TATICCHI M.I., PACINI N., NATALI M., TRONI V., PREARO M.

Risultati preliminari sui possibili effetti tossici di mangimi arricchiti in selenio sul gambero rosso americano (*Procambarus clarkii*)

MINERVINI F., MUTINELLI F., BRUNETTI R., DE GIROLAMO A., VASCELLARI M., PREARO M.

Attività tossica e cancerogena di aflatossina e fumonisina su uova embrionate di trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*)

VANELLI M.

Archeologia ittiopatologica (da una segnalazione del 1924): sopra una grave epizoozia di lucci

Ore 18.30

Assemblea dei Soci

VENERDÌ 27 OTTOBRE 2006



TAVOLA ROTONDA S.I.P.I.



ORGANIZZATA IN COLLABORAZIONE CON

ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DELLE VENEZIE



ASSOCIAZIONE PISCICOLTORI ITALIANI



“PROFILASSI VACCINALE IN ACQUACOLTURA”

EVENTO IN CORSO DI ACCREDITAMENTO ECM

- ORE 09.00-09.30** REGISTRAZIONE DEI PARTECIPANTI
- ORE 09.30-09.45** SALUTO DELLE AUTORITÀ
SALUTO DEL PRESIDENTE A.P.I.
SALUTO DEL PRESIDENTE S.I.P.I.

MODERATORE: DOTT. CLAUDIO GHITTINO

ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DELL'UMBRIA E DELLE MARCHE - PERUGIA

- ORE 09.45-10.30** **“Il sistema immunitario dei teleostei”**
Prof. Giuseppe Scapigliati
Università degli Studi della Tuscia, Viterbo
- ORE 10.30-11.00** **“Strategie di controllo delle malattie infettive in acquacoltura con particolare riferimento alle Rhabdovirosi dei salmonidi”**
Dott. Giuseppe Bovo
Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro (PD)
- ORE 11.00-11.15** *COFFEE BREAK*

- ORE 11.15-12.00** **"Availability of vaccines for rainbow trout, and some Norwegian experiences on vaccination in the aquaculture industry"**
Dr. Paul Mydtlyng
VESO (Centre for Veterinary Contract Research and Commercial Services, Ltd)
- ORE 12.00-12.45** **"Vaccination against VHS in rainbow trout: experimental testing and perspectives related to practical fish farming"**
Dr. Niels Lorenzen
Danish Institute for Food and Veterinary Research, Århus, Denmark
- ORE 12.45-15.00** *PAUSA PRANZO*
- MODERATORE: DOTT. GIUSEPPE BOVO**
ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DELLE VENEZIE – LEGNARO (PD)
- ORE 15.00-15.45** **"Vaccination against Infectious Haematopoietic Necrosis (IHN)"**
Dr. Scott LaPatra
Clear Springs Food, Inc., Buhl, Idaho, USA
- ORE 15.45-16.30** **"The use of vaccine to control bacterial infections in marine fish"**
Prof. Jesus L. Romalde
Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Biología, Santiago de Compostela, Spain
- ORE 16.30-16.45** *COFFEE BREAK*
- ORE 16.45-17.15** **"L'utilizzo di vaccini nel controllo della lattococcosi in trotticoltura"**
Dott. Amedeo Manfrin
Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro (PD)
- ORE 17.15-17.45** **"Problematiche e normative legate alla messa a punto di un vaccino"**
Dott.ssa Loredana Locatelli
Associazione Piscicoltori Italiani, Verona
- ORE 17.45-18.15** **DISCUSSIONE GUIDATA SUGLI ARGOMENTI TRATTATI**
- ORE 18.15-18.45** **VERIFICA APPRENDIMENTO E RILEVAZIONE GRADIMENTO EVENTO**
TEST FINALE DI VALUTAZIONE (QUESTIONARIO A RISPOSTA MULTIPLA)

ORE 21.00

CENA SOCIALE

SABATO 28 OTTOBRE 2006**Ore 09.00-10.30****COMUNICAZIONI SCIENTIFICHE - V SESSIONE**

Moderatore Dott. Loris Alborali

QUAGLIO F., FLORIO D., CAFFARA M., ROGATO F., FIORAVANTI M.L.Osservazioni istopatologiche su Epitelocisti in orate (*Sparus aurata*) d'allevamento**BRUNETTI R., GASPARRI F., ARSIENI P., MARTURANO S., PREARO M.**

Nuove segnalazioni di infezioni batteriche in storioni d'allevamento sul territorio nazionale

FASOLATO L., CORRAIN C., QUALTIERI K., ROSTEGHIN M., ARCANGELI G., BOVO G., MANFRIN A.Identificazione fenotipica e mediante tecniche di biologia molecolare di ceppi di *Vibrio parahaemolyticus* isolati da pesci marini**ZACCONE R., MANCUSO M., CARUSO G., CIUCHINI F., ADONE R., GENOVESE L., MANFRIN A.**Determinazione precoce di *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* e *Listonella (Vibrio) anguillarum* nelle acque: esperimenti in microcosmo**BOSSÙ T., DI NOCERA F., LANNI L., CORTESE M., MONFRINOTTI M., AGUZZI L.**

Moria di Mugilidi nel Golfo di Gaeta (Lazio)

MANUALI E., TIBERI C., DI SALVO A., AGNETTI F., DELLA ROCCA G., GHITTINO C., MALVISI J.Studio sul miglioramento della bioassimilabilità orale di un vaccino anti-*Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* nella spigola (*Dicentrarchus labrax*)**Ore 10.30-11.00****COFFEE BREAK****Ore 11.00-12.45****COMUNICAZIONI SCIENTIFICHE - VI SESSIONE**

Moderatore Dott. Marino Prearo

SALOGNI C., PITOZZI A., PERANTONI P., ALBORALI G.L.*Vagococcus salmoninarum*: descrizione di un focolaio di malattia in riproduttori di trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*)**MANFRIN A., FASOLATO L., CORRAIN C., PAPARELLA A., QUALTIERI K., ROSTEGHIN M., ARCANGELI G., PREARO M., BOVO G.**Utilizzo della Real-time PCR nell'identificazione di 80 ceppi di *Lactococcus garvieae* isolati da trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*)**VOLPATTI D., CONTESSI B., BUONASERA E., GUSMANI L., BERTOIA M., GALEOTTI M.**Valutazione della protezione indotta da frazioni antigeniche di *Lactococcus garvieae* in trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*)

GUANDALINI E., ESPOSITO A., LUCCHETTI D., FABRIZI L., CONI E.

L'impiego di eritromicina in acquacoltura: tempi di deplezione e di sospensione per le trote

SALOGNI C., ZANONI M., GELMETTI D., TAGLIABUE S., PACCIARINI M.L., ALBORALI G.L.

Infezione da *Mycobacterium marinum*: descrizione di un focolaio di malattia in trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*) e fario (*Salmo trutta*) d'allevamento

PEZZOLATO M., VARELLO K., PREARO M., MASCARINO D., PAVOLETTI E., BOZZETTA E.

Valutazione delle lesioni istopatologiche indotte da *Mycobacterium gordonae* in *Trichogaster trichopterus*

SALOGNI C., ZANONI M., PACCIARINI M.L., TAGLIABUE S., ALBORALI G.L.

Micobatteriosi nelle specie ittiche ornamentali: risultati di cinque anni di monitoraggio

ABSTRACT

VALIDAZIONE DEGLI ESAMI ITTIOPATOLOGICI SECONDO LA NORMATIVA VIGENTE: APPROCCIO INIZIALE

Prearo M., Dellepiane M.*, Arsieni P., Brunetti R., Gianola C., Ercolini C.***, Pistone G.

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Via Bologna, 148 – 10154 Torino; * Sezione di Savona; ** Sezione di La Spezia*

Con la Norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025, l'accreditamento degli esami anche di tipo qualitativo deve sottostare a precise indicazioni: pertanto le prove accreditate devono subire un processo di validazione che porta ad avere parametri oggettivi di ripetibilità, riproducibilità, sensibilità e specificità del metodo. Un approccio di validazione di tipo tradizionale, utilizzato generalmente per i metodi di tipo quantitativo, risulta essere particolarmente indaginoso e non sempre sostenibile per tutte le analisi di tipo qualitativo, dove risulta molto importante la capacità e la conoscenza di base dell'operatore. Presso l'U.O. Laboratorio di Ittiopatologia e Acquacoltura dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta di Torino, da anni sono accreditate alcune prove di tipo prettamente qualitativo, dove l'esperienza personale gioca un ruolo decisivo nell'espletamento delle stesse; le norme in vigore hanno obbligato il Sistema Qualità ed il laboratorio a cercare soluzioni sostenibili per procedere alla validazione degli stessi, seppur con notevoli difficoltà. Proprio per tale complessità e per la politica dell'Ente di mantenere l'accreditamento anche per tali tipologie di esami, si vuole proporre lo schema di validazione utilizzato dall'IZS di Torino per la validazione di tre metodi: l'esame anatomopatologico, l'esame parassitologico a fresco per la ricerca di parassiti cutaneo-branchiali e l'esame colturale con tecniche di prelievo per la semina su terreni di primo isolamento. Per tutti gli esami in questione è stato approntato un piano di validazione, secondo le modalità descritte da una procedura gestionale dell'Assicurazione Qualità dove, a seconda della tipologia di esame, tale problema è stato affrontato in modo diverso. Per quanto riguarda l'esame anatomopatologico, essendo impossibile effettuare analisi di ripetibilità sia intralaboratorio che interlaboratorio differite nel tempo per l'unicità e l'estrema deperibilità del campione, e basandosi lo stesso sulla capacità di riconoscere e descrivere le lesioni da parte dell'operatore, è stato adottato un piano di validazione in cui le prestazioni da verificare sono risultate solamente la ripetibilità intermedia o riproducibilità intralaboratorio e la riproducibilità interlaboratorio. Anche nel caso dell'esame parassitologico, subentra la problematica della difficoltà di effettuare prove di ripetibilità e di riproducibilità differite, in quanto tale esame effettuato direttamente dal pesce risulta nel tempo impossibile da eseguire per le stesse problematiche viste precedentemente. Per entrambi gli esami si è cercato di ovviare a tali problematiche, utilizzando una serie di materiale iconografico che riproduca il quadro diagnostico da descrivere in modo identico ed inalterato nel tempo per tutti gli operatori che devono svolgere le operazioni di lettura. L'utilizzo di tutti gli operatori del laboratorio abilitati e la valutazione mediante il calcolo dell'indice Kappa di Cohen, ha portato ad ottenere la validazione del metodo secondo il piano prestabilito. Per l'esame colturale di primo isolamento invece è stato adottato un piano di validazione classico con gli indici di accuratezza e precisione da verificare.

Per valutare la robustezza dell'impianto di validazione è stato costituito un primo circuito interlaboratorio su tutti gli esami sopraccitati, ottenendo dei buoni risultati. Alla visita ispettiva dell'ente accreditante (SINAL), i risultati ottenuti sono stati valutati positivamente, anche se appare necessario implementare tali dati, cercando di incentrare maggiormente gli sforzi sulle procedure manuali.

EFFETTO INIBITORIO DELL'EICAR SULLA REPLICAZIONE DI BETANODAVIRUS

Ciulli S., Galletti E., Dal Pozzo F., Scagliarini A.

Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia animale - Alma Mater Studiorum, Università di Bologna

L'infezione da *Betanodavirus* è responsabile dell'EncefaloRetinopatia Virale, una malattia che causa mortalità e lesioni nervose in molte specie ittiche marine d'allevamento. I *Betanodavirus*, virus a ssRNA appartenenti alla famiglia Nodaviridae, sono ampiamente diffusi nel mondo anche nell'ambiente naturale. Il controllo della malattia è attualmente affidato alla selezione di riproduttori indenni ed alla profilassi diretta in avannotteria, mentre non esistono efficaci metodi di controllo da attuarsi negli allevamenti all'ingrasso dove l'elevata densità ittica e il difficile controllo delle possibili vie di ingresso del virus rendono problematica la prevenzione dei focolai estivi. Recenti studi hanno evidenziato l'efficacia e l'applicabilità delle sostanze antivirali anche nella patologia ittica individuando principi attivi inibenti la crescita virale di patogeni dei pesci.

Questo lavoro ha lo scopo di valutare l'attività antivirale *in vitro* nei confronti di *Betanodavirus* dell'EICAR (5-ethynyl-1-β-D-ribofuranosylimidazole-carboxamide), uno dei più potenti composti ad attività antivirale, analogo della ribavirina e inibitore dell'inosina monofosfato deidrogenasi.

La citotossicità del composto è stata valutata nei confronti di monostrati di cellule SSN-1. Le cellule sono state incubate con diluizioni seriali di EICAR per 3 giorni, quindi il numero di cellule per pozzetto è stato contato tramite Coulter (Beckman, USA). La citotossicità è stata espressa come la concentrazione che riduce la crescita cellulare del 50% (CC₅₀) in riferimento al numero di cellule presenti in un controllo non trattato. L'attività antivirale è stata valutata testando diluizioni seriali di EICAR su monostrati di SSN-1 infettati con un titolo virale noto. Dopo tre giorni di incubazione a 25°C è stato valutato l'effetto citopatico del virus ed è stata definita la concentrazione inibente 50% (IC₅₀). L'indice di selettività (SI) dell'EICAR è stato calcolato come il rapporto tra il valore di CC₅₀ e di IC₅₀. Per meglio definire l'attività antivirale osservata per l'EICAR sono state quindi condotte prove di valutazione della carica virale su piastre da 6 pozzetti. Il virus è stato quantificato nel lisato cellulare e nel surnatante della coltura dopo 24, 48 e 72 ore di incubazione sia con real time PCR che con titolazione virale in piastre da 96 pozzetti.

Le prove di citotossicità hanno dimostrato che l'EICAR non ha effetto tossico su cellule SSN-1 fino ad una concentrazione di 100 µg/ml. I saggi di attività antivirale hanno, invece, evidenziato che l'EICAR determina una riduzione della crescita virale che si attesta su valori di IC₅₀ pari a 10,5 µg/ml. L'indice di selettività del composto risulta quindi essere superiore a 9,5. L'attività antivirale dell'EICAR è stata confermata anche tramite le prove di titolazione e quantificazione virale tramite real time PCR del surnatante e del lisato cellulare trattati con diverse concentrazioni del composto (30, 15, 5, 2 µg/ml). In particolare è stata evidenziata un'inibizione della replicazione virale statisticamente significativa rispetto al controllo virale sia a livello intracellulare che extracellulare a tutti i tempi testati, mentre non è stata evidenziata differenza nell'efficacia delle varie diluizioni dell'EICAR.

In conclusione si può affermare che l'EICAR ha mostrato di svolgere attività antivirale nei confronti di *Betanodavirus*; sarà interessante approfondire con ulteriori studi la conoscenza sul meccanismo d'azione con il quale questa sostanza inibisce la crescita virale di *Betanodavirus*.

Ringraziamenti: gli Autori ringraziano il Dr. R. Snoeck del Rega Institute for Medical Research, K.U. Leuven, Belgio, per aver fornito l'EICAR.

RISCONTRO ISTOLOGICO E IMMUNOISTOCHEMICO DI ENCEFALORETINOPATIA VIRALE IN LARVE DI ORATA (*SPARUS AURATA*, L. 1578) ALLEVATE IN ITALIA

Beraldo P.¹, De Nigris G.², Rogato F.³, Galeotti M.¹

¹Dipartimento di Scienze Animali, Università degli Studi di Udine; ²MARIBRIN S.r.l., Brindisi; ³Skretting Italia, Mozzecane (VR)

Dalla seconda metà degli Anni '80, l'encefaloretinopatia virale, VER (OIE, 2003), neuropatia infettiva sostenuta da un virus appartenente al genere *Betanodavirus*, famiglia Nodaviridae, rappresenta uno dei fattori limitanti la produzione di diverse specie ittiche (Munday *et al.*, 2002). Dalla prima descrizione, il virus ha colpito più di 31 specie ittiche marine, distribuite in 16 famiglie differenti, con una distribuzione mondiale. Nel bacino del Mediterraneo la VER si è rapidamente diffusa dai primi anni '90, interessando, soprattutto il branzino (*Dicentrarchus labrax*) e, in seguito, l'ombrina (*Umbrina cirrosa*). Al contrario, le segnalazioni d'infezioni spontanee di VER in *Sparus aurata* sono state raramente documentate. Sebbene l'orata sia stata infettata sperimentalmente, si ritiene sia una specie piuttosto resistente alla VER, documentato dal fatto che, durante gravi episodi di VER in larve di branzino o altre specie, le larve di orata non vengano interessate dall'infezione. Alcuni autori hanno documentato, tramite infezione sperimentale, come questa specie, sebbene sensibile al virus, possa piuttosto rappresentare un vettore asintomatico di *Betanodavirus*, particolarmente patogeni per il branzino.

L'intento descrittivo di quest'indagine è di documentare un episodio di mortalità massiva in larve di orata di circa 15 giorni di età, riconducibile a encefalopatia-retinopatia virale come dimostrato dagli esami istopatologici e immunoistochimici.

Le larve, allevate in vasche di vetroresina alla densità di 150 ind/l e rifornite di acqua di mare filtrata e sterilizzata (temperatura 20-21°C e salinità 40‰), presentavano sintomi caratterizzati da timpanismo della vescica natatoria, distensione addominale, letargia, anoressia e alterazione dell'assetto (posizione iponeustonica). Durante la fase acuta della mortalità, sono stati prelevati due campioni di larve moribonde (19 e 29 giorni di età) che sono stati fissati in formalina tamponata al 4%. I campioni sono stati processati secondo procedure standard di laboratorio al fine di ottenere sezioni in paraffina da destinare all'esame istopatologico, previa colorazione con ematossilina-eosina, e all'esame immunoistochimico, che ha previsto l'utilizzo di due anticorpi monoclonali anti-VER (forniti dall'IZS della Lombardia ed Emilia-Romagna). Le osservazioni istopatologiche hanno messo in risalto la presenza delle caratteristiche lesioni vacuolari del sistema nervoso centrale e periferico ascrivibili alla VER, localizzate soprattutto nella parte anteriore del cervello ma, anche, nel midollo allungato, notocorda e negli strati retinici (strato granulare). L'immunoperossidasi ha confermato la presenza del virus nel cervello e negli strati retinici, evidenziata da una forte positività in corrispondenza delle suddette lesioni, contraddistinta dall'intensa colorazione marrone della diaminobenzidina.

Vagliata la letteratura esistente, questo episodio sembra essere il primo caso di mortalità massiva in larve di orata a causa di un'infezione spontanea di encefaloretinopatia virale in Italia.

Munday B.L., Kwang J., Moody N. (2002) Betanodavirus infections of teleost fish: a review. *J. Fish Dis.*, 25: 127-142.

OIE (2003) Viral encephalopathy and retinopathy. In: *Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals*,. Office International des Epizooties (OIE), Paris, France: 135-141.

STUDIO SUI MECCANISMI IMMUNITARI DI *CHAMELEA GALLINA* (L. 1758)

Mosca F., Calzetta A., Narcisi V., Pennisi L., Gioia L., Tiscar P.G.

Dipartimento di Scienze Biomediche Comparate, P.zza A. Moro 45, 64100 Teramo

La vongola comune *Chamelea gallina* (L. 1758) costituisce una specie predominante del litorale Adriatico e, nel corso degli ultimi decenni, la risorsa biologica è stata sottoposta ad una progressiva crescita dello sforzo di pesca che ne ha inficiato gli stock naturali. Tuttavia, gli episodi di mortalità, sovente riscontrati, non sembrano aver trovato una loro specifica comprensione e conseguente risoluzione nelle politiche gestionali. In tal senso, numerosi fattori ambientali ed antropici sembrano svolgere un ruolo critico sullo stato di salute dei popolamenti di *Ch. gallina*, influenzandone la crescita, il reclutamento e la mortalità. La ricerca di parametri in grado di misurare la condizione omeostatica degli organismi ha focalizzato l'attenzione sui meccanismi immunitari di *Ch. gallina*, evidenziando non solo alcuni aspetti morfo-funzionali del processo fagocitario, ma anche il ruolo immunoregolatore di taluni fattori di stress. Tuttavia, l'esiguità numerica delle ricerche condotte finora rende ancora poco chiaro il meccanismo fagocitario di *Ch. gallina*, soprattutto in riferimento alla effettiva capacità di inglobamento del not-self e di una completa attivazione del "burst respiratorio" da parte degli emociti.

Il presente lavoro ha lo scopo quindi di contribuire alle conoscenze del sistema difensivo di *Ch. gallina*, valutando le proprietà ameboidi ed ossidative degli emociti a seguito di stimolazione *in vitro* con batteri (*Vibrio* sp., *Aeromonas* sp.) e lieviti (*Saccharomyces cerevisiae*), impiegando la 1,2,3-DHR come tracciante fluorescente. Le prove sono state effettuate mediante analisi di vitalità cellulare (AVC), citometria a flusso (CF), fluorimetria in micrometodo (FM) e microscopia confocale (MC). Inoltre, la valutazione è stata effettuata mediante AVC e CF su campioni provenienti da soggetti di taglia differente. La CF ha individuato differenti popolazioni emocitarie sulla base di caratteristiche morfologiche, evidenziandone una risposta ossidativa molto lieve allo stimolo fagocitario, direttamente proporzionale alle dimensioni ed alla complessità strutturale delle cellule. La FM ha confermato in termini quantitativi la scarsa abilità ossidativa degli emociti, così come la MC ha permesso di visualizzare l'intensità intracellulare del processo che, tuttavia, è stato riscontrato in un esiguo numero di cellule, peraltro in assenza di evidenti segni microscopici di strutture fago-lisosomiali. Le analisi condotte su soggetti di taglia differente hanno evidenziato una maggiore capacità ossidativa negli organismi più adulti, probabilmente legata alla maggiore percentuale di cellule identificabili come granulociti mediante CF. La AVC ha fornito la distribuzione cellulare dei diametri, dimostrando un progressivo incremento dei valori medi con l'aumento della taglia, mentre la stimolazione fagocitaria ha indotto un'attivazione ameboide degli emociti, misurata attraverso la riduzione del parametro circolarità, anche in questo caso direttamente proporzionale alla grandezza degli organismi.

In conclusione, il lavoro ha permesso di evidenziare e misurare la capacità ameboide e l'attività ossidativa di emociti di *Ch. gallina*, processi caratteristici della fagocitosi, che, tuttavia, nella vongola comune appaiono meno evidenti rispetto ad altri modelli biologici, sia in termini di intensità della risposta che di numero di cellule coinvolte. Inoltre, la differente abilità ameboide ed ossidativa di cellule provenienti da soggetti di diversa taglia lascia supporre una capacità difensiva degli organismi dipendente dal fattore età. Ulteriori studi dovranno essere rivolti non solo alla ottimizzazione delle metodiche, al fine di fornire parametri applicativi nella misurazione dell'omeostasi degli organismi, ma anche alla comprensione dei meccanismi di base che regolano il processo fagocitario in *Ch. gallina*, considerando anche quegli aspetti connessi all'ontogenesi del sistema immunitario.

VARIAZIONI DELLO STATO DI BENESSERE DI *MYTILUS GALLOPROVINCIALIS* (LMK, 1819) IN CONDIZIONI DI STOCCAGGIO

Narcisi V., Calzetta A., Mosca F., Tiscar P.G.

Dipartimento di Scienze Biomediche Comparate, Università degli Studi di Teramo, P.zza Aldo Moro 45, 64100 Teramo

Lo stress provoca negli organismi uno squilibrio dei normali processi fisiologici e dunque un'alterazione dello stato di benessere degli individui; nei molluschi bivalvi le conseguenze negative di condizioni stressanti coinvolgono soprattutto il sistema immunitario e la fagocitosi. Tra gli eventi stressanti che si rinvengono durante le fasi di stoccaggio dei molluschi ed in alcune situazioni di allevamento, risulta particolarmente frequente l'ipossia.

Al fine dunque di valutare variazioni nello stato di benessere dei molluschi in condizioni di stoccaggio, sono stati utilizzati come oggetto di studio i mitili (*Mytilus galloprovincialis*) ponendo particolare attenzione al loro sistema immunitario ed all'individuazione di fattori coinvolti nella risposta dell'organismo all'ipossia.

Le prove sono state condotte su mitili stabulati in acquario da cui è stato prelevato un gruppo omogeneo mantenuto fuori dall'acqua a temperatura di refrigerazione fino ad un massimo di 4 giorni. Il lavoro ha valutato il ruolo di due importanti mediatori del processo fagocitario, quali il Calcio (Ca^{++}) e l'Ossido Nitrico (NO), in seguito a stimolazione fagocitaria rappresentata da lieviti *Saccharomyces cerevisiae*. Contemporaneamente è stata calcolata la produzione di radicali dell'ossigeno (ROS) ed il parametro morfologico circolarità. In aggiunta è stata valutata l'espressione mantellare di proteine dello shock termico a 70 kDA (HSPs 70).

I risultati evidenziano un aumento nella produzione di Ca^{++} in seguito a stimolazione fagocitaria in entrambi i gruppi, confermando il ruolo fondamentale dello ione nel determinare la motilità citoscheletrica da cui dipende l'attività locomotoria cellulare. Nei soggetti mantenuti in condizioni di stoccaggio tuttavia, la produzione di Ca^{++} è minore è minore rispetto al controllo mantenuto in acquario. Al contrario la rilevazione di NO registrata risulta incrementata similmente in entrambi i campioni.

La produzione di ROS diminuisce nel tempo nei mitili stoccati, mostrando una minore attività del *burst* respiratorio che fa seguito alla fagocitosi. In aggiunta, in questo stesso gruppo di soggetti, la circolarità emocitaria segnala una percentuale maggiore di cellule più rotonde (range 0,75-1). Si è inoltre determinata una riduzione dell'espressione delle HSPs 70 proporzionalmente alla durata dell'ipossia.

Complessivamente i risultati mostrano come lo stoccaggio conduca ad un progressivo indebolimento della risposta difensiva evidenziabile nella minore produzione di radicali e nell'aumento della percentuale di emociti circolari.

Al fine di evidenziare eventuali differenze con i mitili stoccati in condizioni sperimentali si è provveduto ad acquistare soggetti dal commercio al dettaglio; di questi si è creato un gruppo controllo, mantenuto in acqua, ed un gruppo conservato a temperatura di refrigerazione.

Confrontando i risultati ottenuti dai molluschi stabulati in acquario con quelli di mitili prelevati dal commercio al dettaglio, si evidenziano delle differenze nella produzione di ROS e nella circolarità emocitaria che lasciano ipotizzare l'esistenza di condizioni stressanti aggiuntive che intervengono lungo la filiera produttiva e distributiva.

In conclusione, il lavoro svolto ha permesso di monitorare le modificazioni dello stato di benessere di mitili durante la fase di commercializzazione, in una prospettiva di qualificazione dei prodotti e di prolungamento della loro "shelf life" commerciale.

STUDIO DELLA PERKINSOSI NELLA VONGOLA FILIPPINA (*RUDITAPES PHILIPPINARUM*) ALLEVATA NELLA LAGUNA DI MARANO (NORD ADRIATICO)

Ceschia G.¹, Sgro L.¹, Capelli G.², Zentilin A.³, Ramirez Tafur R.¹, Sello M.¹

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Laboratorio Patologia Molluschi, Via della Roggia 102, 33030 Basaldella di Campofornido (UD); ² Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Parassitologia, Viale dell'Università 10, 35020 Legnaro (PD); ³ Acquacoltura Lagunare Marinetta Scarl, Via Girolamo Raddi 2, 33050 Marano Lagunare (UD)

La Perkinsosi è una parassitosi molto studiata, attribuendole, talvolta, responsabilità diretta in casi di mortalità più o meno grave nell'allevamento di *Ruditapes decussatus* e *R. philippinarum* in Portogallo e Spagna. Data l'elevata presenza di *Perkinsus* sp. nelle vongole filippine presenti nella Laguna di Marano (Nord Adriatico), riscontrata dall'analisi di diversi campioni in questi ultimi anni, la presente ricerca si propone di osservare la Perkinsosi durante un ciclo di allevamento e di valutare l'influenza dei parametri ambientali sullo sviluppo della patologia. Mensilmente venivano effettuati dei campionamenti in due zone di allevamento (ingrasso): Zona A - Porto Lignano, substrato con la componente sabbiosa del 20%, zona fortemente influenzata dalla vivificazione marina attraverso la bocca di Porto Lignano e all'immissione di acqua dolce dai fiumi sfocianti a Nord della Laguna di Marano; Zona B - Isola di Marinetta, substrato con la componente sabbiosa del 10%, zona meno esposta ai flussi idrici essendo protetta dal cordone litorale, caratterizzata da bassi fondali. Su ogni campione, costituito da 50 soggetti, sono stati condotti mensilmente per due anni esami istologici ed esami colturali quantitativi in Ray's Fluid Thioglycollate Medium (RFTM). *Perkinsus* sp. è stato rinvenuto in quasi tutti in soggetti esaminati: grado di infestazione 76-100%. Nella zona A il numero di spore per soggetto varia tra 0 e 1.320.000; quello di spore/g tra 0 e 1.702.127. Il valore medio spore/g si colloca tra 13.805 (marzo 2004) e 219.647 (ottobre 2003). Nella zona B il numero di spore per soggetto varia tra 0 e 3.000.000; quello di spore/g tra 0 e 3.273.137. Il valore medio spore/g si colloca tra 43.794 giugno 2003) e 783.390 agosto 2004). Le vongole allevate nella zona B mostrano una media di spore significativamente più elevata di quelle della zona A. La diversa salinità riscontrata tra le due zone e la diversa composizione del substrato possono aver influenzato la variazione del grado di infestazione da *Perkinsus* sp.

TWO-YEARS MONITORING ON PARASITE INFECTIONS OF COMMERCIAL BIVALVES FROM ST. GILLA LAGOON (SARDINIA, SOUTH WESTERN MEDITERRANEAN).

Culurgioni J.¹, D'Amico V.¹, De Murtas R.¹, Canestri Trotti G.², Figus V.¹

¹Dip. Biologia Animale ed Ecologia - Università di Cagliari; ²Dipartimento di Biologia Animale e dell'Uomo, Università degli Studi di Torino

St. Gilla lagoon (Cagliari, Italy), the largest lagoon in south Sardinia, is one of the most important brackish areas of the whole region. Fishing and aquaculture, actively followed within this area, represent an important share of the entire "settore pesca", but the frequent restrictions of these practices due to organical pollution make these resources unbalanced and discontinuous. This interruptions have negative economic and occupational consequences. Between July 2004 and July 2006, within a monitoring program on the parasite communities occurring in molluscs and fishes living in this lagoon, commercial size samples of *Tapes (Ruditapes) decussatus* L. (Veneridae), *Cerastoderma glaucum* Poiret 1789 (Cardiidae) and *Mytilus galloprovincialis* L. (Mytilidae) were parasitologically examined. All these three species are natural in St. Gilla. The first two live in beds diffused almost in the whole bottom of the lagoon, from where they are fished by traditional technics, while the third species is farmed in long lines situated in the "A" zone (microbiologically safe) of the lagoon. A second stock of *M. galloprovincialis*, not commercially exploited, lives attached on the wood structures named "lavorieri". Less than 6 hours after sampling the specimens were measured and opened. Sections (1 cm²) of mantle, gill and intestinal tissues were squashed between glass slides and examined microscopically for protozoan parasites. Mantle and gill fragments of the same specimens were also placed in Ray's Fluid Thyoglicollate Medium and examined microscopically after 10 days for the presence of *Perkinsus* sp. hypnospores. Parts of digestive gland, visceral mass, gonads and foot were observed under a dissecting microscope for metazoan parasites. Infection prevalence (P%) and its 95% confidence interval (CI) have been calculated. For protozoan parasites mean density (D) ± SE and abundance (A) ± SE (evaluated on the basis of the mean number of parasites in 10 microscope fields at 400x per tissue sample), for metazoan parasites mean intensity (I) ± SE and abundance ± SE, have been determined. Results reported in Table 1 show that *T. decussatus* has the highest parasite richness.

Host (n. examined)			<i>T. decussatus</i> (399)		<i>C. glaucum</i> (149)		<i>M. galloprovincialis</i> (123)	
	Stage	Site	P%	I	P%	I	P%	I
Infected			89.5	-	89.3	-	7.3	-
Infected by:								
<i>Perkinsus</i> spp.	HS	I, Gi	83.2	15.3	11.4	3.3	-	-
<i>Nematopsis</i> spp.	OC	I, Gi	31.6	3.3	89.3	9.9	-	-
<i>B. bacciger</i>	S, S+C	Go, VM	20.3	n.e.	-	-	-	-
<i>L. longicystis</i>	MC	F, S	32.3	4.3	-	-	-	-
<i>G. choledochus</i>	S, MC	VM, M	1.8	3.5	-	-	-	-
<i>B. haimeana</i>	S, S+C	VM, M	-	-	0.7	n.e.	-	-
<i>P. maculatus</i>	S, S+C	VM, M, BV	-	-	-	-	4.1	n.e.
<i>Paravortex cardii</i>	A, J	I	13.3	4.3	-	-	0.8	1.0
Nematoda sp.	L	M	0.3	1.0	1.3	1.0	2.4	2.0

HS = hypnospore; OC = oocyst; S = sporocyst; C = cercaria; MC = metacercaria; A = adult; J = juvenile; L = larva; I = intestine; Gi = gills; Go = gonads; VM = visceral mass; F = foot; S = syphon; M = mantle; BV = blood vessels.

Table 1 – Parasite infections in commercial bivalves from St. Gilla lagoon (Sardinia, Italy).

PROVE DI TRATTAMENTO DELL'INFESTIONE DA *POLYDORA CILIATA* IN *CRASSOSTREA GIGAS*

Fenzi G.A., Spiga B., Salati F.

Centro per l'Ittiopatologia e l'Acquacoltura, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna, 09170 Oristano

Crassostrea gigas è da annoverarsi tra le specie che rivestono maggiore importanza nella molluschicoltura. Questa specie è stata introdotta dal Giappone in Europa all'inizio degli anni '70, diventando in poco tempo uno dei principali prodotti dell'acquacoltura mondiale. La natura filtrante di questi bivalvi consente una produzione su larga scala ed in ambienti naturali, non necessitando di un'alimentazione artificiale. Tuttavia, in presenza di acque eutrofiche e ad elevato arricchimento organico, questi animali vengono sottoposti a un maggiore rischio di infezioni parassitarie.

Polydora ciliata, polichete della famiglia degli Spionidi, è uno dei principali parassiti opportunisti capaci di insediarsi in diversi molluschi di allevamento, tra cui *C. gigas*. L'attività di insediamento del parassita porta alla produzione di "bolle" di madreperla da parte dell'ospite provocando atrofia e, nei casi più gravi, il distacco del muscolo adduttore; inoltre, questa parassitosi porta ad un deprezzamento del prodotto ed alla distruzione del mollusco in caso di grave infestione.

Lo scopo del presente studio è stato quello di trovare un trattamento in grado di ridurre la presenza di *P. ciliata* in *C. gigas* da applicarsi anche su campo, in quanto può essere parassitato anche il 70% delle ostriche in allevamento. Sono stati pertanto utilizzati tre distinti prodotti: uno a base di acido peracetico ed acqua ossigenata, uno a base di formaldeide ed un ultimo costituito da cloruro di sodio.

Per ogni trattamento è stato utilizzato un campione di 50 soggetti di *C. gigas*. I trattamenti sono stati effettuati con concentrazioni diverse del prodotto a base di acido peracetico ed acqua ossigenata (15 e 30 ml/m³), formalina (10 e 100 ml/m³) e soluzione satura di NaCl (360 g/l).

I risultati dei trattamenti possono essere così riassunti: il prodotto a base di acido peracetico ed acqua ossigenata ha fatto registrare una mortalità del parassita variabile dal 25% al 67% con tuttavia una mortalità dell'ostrica, rispettivamente, dello 0 e del 9%; la formalina ha indotto una mortalità del parassita variabile dall'11 al 42% e quella dell'ostrica, rispettivamente, dello 0 e dell'80%. Infine, il trattamento con NaCl ha fatto registrare una mortalità del parassita del 95% e nulla quella dell'ospite.

In conclusione, si può osservare una chiara efficacia con elevata mortalità di *P. ciliata* nel trattamento con NaCl ed una sopravvivenza totale dell'ospite. Ciò è probabilmente dovuto all'elevato shock osmotico creato dal sale all'interno della sacca madreperlacea del parassita, e dalla sua successiva cristallizzazione sulla superficie della conchiglia. I trattamenti con la formalina hanno invece evidenziato un'azione particolarmente invasiva sull'ostrica con mediocri risultati sul parassita. Il prodotto a base di acido peracetico ed acqua ossigenata ha causato danni limitati all'ospite solo al dosaggio superiore, senza essere particolarmente efficace sul parassita, confermando la scarsa capacità di questo prodotto nell'agire in maniera selettiva su *P. ciliata*.

GESTIONE VETERINARIA NEL RECUPERO DI TARTARUGHE MARINE (*CARETTA CARETTA*)

Nardini G.¹, Bielli M.², Scaravelli D.³, Vignoli M.⁴

¹Fondazione Cetacea, Riccione (RN); ² Libero professionista, Novara; ³ Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale, Università di Bologna, Ozzano Emilia (BO); ⁴Clinica Veterinaria dell’Orologio, Sasso Marconi (BO)

La pressione da parte delle attività dell’uomo sull’habitat delle tartarughe marine è sempre maggiore. Analizzando le cause di morbilità e mortalità in particolare in *Caretta caretta* dell’Adriatico settentrionale, oltre agli effetti da bycatch e l’ingestione di corpi estranei, l’evento traumatico rappresenta una percentuale rilevante dei casi controllati totali e diviene prevalente in quelli ricoverati nei centri di recupero. Inoltre molti soggetti mostrano concomitanti di segni di altre patologie quali ad esempio infezioni batteriche e/o parassitarie, squilibri metabolici, ecc. Molte di queste sindromi portano l’animale ad un prolungato riposo forzato in emersione e quindi ad una maggiore esposizione al rischio da impatto con natanti. Pertanto, da un punto di vista eziopatogenetico, non è raro che il trauma rappresenti solamente l’evento culminante e più evidente e giunga così ad oscurare le cause prime di malattia.

La gestione del paziente “traumatizzato” rappresenta un aspetto fondamentale nel processo di cura e recupero delle tartarughe marine sia per quanto riguarda la componente diagnostica che quella terapeutica.

Per quanto concerne gli approfondimenti diagnostici, accanto a tecniche tradizionali che costituiscono lo standard di base dei centri di recupero per i cheloni (ematochimica, radiologia, endoscopia) e che consentono di diagnosticare la maggior parte delle patologie, è possibile ricorrere ad ausili diagnostici più specialistici. La tomografia assiale computerizzata (TC) e la risonanza magnetica (RM) consentono una chiara visualizzazione delle strutture interne nonostante la presenza del robusto carapace e permettendo una valutazione più precisa delle lesioni. L’alta densità delle ossa dermiche costituisce comunque una problematica importante, rendendo i risultati della diagnostica per immagini rimarchevoli soprattutto quando corredati anche da un approccio ecografico che sfrutti le finestre pettorali ed addominali. Particolare attenzione va data in queste fasi ad un’idonea sedazione e all’attento monitoraggio dei parametri fisiologici.

In base all’esperienza da noi maturata, una migliore accuratezza in fase diagnostica si traduce in genere in un più tempestivo ed efficace intervento sul paziente ricoverato e fornisce preziosi elementi di valore prognostico.

Nel campo della terapia, la gestione di lesioni superficiali a carico di tessuti molli e duri degli animali acquatici, ed in questo caso dei cheloni marini, rappresenta una sfida importante e spesso condizionante i tempi di ospedalizzazione. A tal proposito l’utilizzo del laser a scopo chirurgico e terapeutico si sta dimostrando estremamente valido nel trattamento di ferite superficiali.

La standardizzazione delle pratiche diagnostiche e terapeutiche da applicare ai cheloni marini consentirà un accorciamento dei tempi di ricovero favorendo un loro più precoce e facile reinserimento in natura.

UN CASO DI CARCINOMA INTESTINALE IN KILLIFISH AFRICANO (*FUNDULOPANCHAX SJOSTEDTI* L.)

Magi G.E.¹, Di Cicco E.², Renzoni G.¹, Rossi G.¹

¹Dipartimento di Scienze Veterinarie, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Camerino, Matelica (MC); ²Libero professionista

Un killifish africano di circa 2 anni, appartenente alla specie *Fundulopanchax sjostedti*, mantenuto in un acquario riprodotto il biotopo naturale con altri soggetti della stessa specie, è stato esaminato per la presenza di un vistoso rigonfiamento a livello del tronco, comparso da circa un mese e mezzo e caratterizzato da accrescimento rapido, accompagnato da anoressia dell'animale. L'esame parassitologico esterno è risultato negativo e dal punto di vista terapeutico è stata somministrata enrofloxacin per bagno. Dopo circa 20 giorni le gravi condizioni generali, caratterizzate da letargia, notevole inscurimento cutaneo e aumento volumetrico addominale hanno fatto propendere per l'eutanasia del soggetto che è stato immediatamente sottoposto a necropsia. Macroscopicamente è stata evidenziata la presenza di una notevole massa, dall'aspetto irregolare, coinvolgente quasi tutto il tratto intestinale e distendente la cavità celomatica. Campioni di branchie, fegato, milza, cuore, intestino, massa intestinale e rene sono stati fissati in formalina neutra tamponata, processati ed inclusi in paraffina. Sezioni di 4 µm sono state colorate con ematossilina-eosina, tricromica di Masson e Alcian-PAS. Sezioni rappresentative di tessuto neoplastico sono state sottoposte ad esame immunohistochimico secondo la metodica avidina-biotina perossidasi utilizzando anticorpi diretti contro vimentina, citocheratina (CK) clone AE1/AE3 e PCNA. L'esame istopatologico della massa ha evidenziato una proliferazione di cellule di tipo epiteliale, in atteggiamento tubulo-papillare scirroso. Le cellule proliferanti erano caratterizzate da nuclei grandi, nucleoli evidenti ed elevata attività mitotica. Nell'ambito dello stroma neoplastico erano presenti aree di metaplasia cartilaginea e zone di calcificazione. Alla colorazione Alcian-PAS è stata riscontrata una scarsa attività secernente delle cellule tumorali. Non sono state riscontrate metastasi negli altri organi esaminati. Le cellule neoplastiche sono risultate immunopositive per citocheratine A1/A3 e PCNA, mostrandosi non reattive all'anticorpo specifico per vimentina. In base alla morfologia e considerata la positività immunohistochimica nei confronti delle citocheratine, è stata emessa una diagnosi di carcinoma intestinale. Le neoplasie del tratto gastro-enterico a differente istogenesi sono ben conosciute negli animali domestici mentre sono estremamente rare nelle specie ittiche. Da una ricerca effettuata nel Registry of Tumors in Lower Animals (RTL, Washington), su oltre 6000 casi di neoplasie descritte nelle specie ittiche dal 1965 ad oggi solo lo 0,2% è rappresentato da tumori derivanti dal tratto gastro-intestinale; inoltre la maggioranza di questi è stata indotta in maniera sperimentalmente. Nel nostro caso si può ipotizzare una genesi spontanea della neoplasia viste le condizioni di mantenimento del soggetto (assenza di sostanze cancerogene) e considerando l'età avanzata. Alcune specie di killifish, compresa quella oggetto di studio, sono definite specie "annuali" ovvero non vivono nel loro ambiente naturale per più di nove mesi, mentre in cattività possono raggiungere al massimo i 2-3 anni di vita. In condizione di cattività quindi possono sviluppare tutta una serie di patologie correlate al notevole invecchiamento, comprese quelle neoplastiche. Per tale ragioni i killifish sono usati anche come modello per gli studi sull'invecchiamento cellulare e sulla carcinogenesi. Riteniamo quindi che anche il caso segnalato sottintenda il ruolo preminente del protratto invecchiamento cellulare nella patogenesi della neoplasia.

GIRODATTILOSI IN ORATE (*SPARUS AURATA*) ALLEVATE NEL MAR ADRIATICO

Paladini G.¹, Gustinelli A.¹, Di Cave D.², Beraldo P.³, Moscato M.⁴, Fioravanti M.L.¹, Shinn A.P.⁵

¹Dip. Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale, Università di Bologna, Ozzano Emilia (BO); ²Dip. Sanità Pubblica e Biologia Cellulare, Università di Roma “Tor Vergata”; ³Dip. Scienze Animali, Università di Udine; ⁴Veterinario Libero Professionista; ⁵Institute of Aquaculture, University of Stirling, UK

Le infestazioni sostenute da parassiti del genere *Gyrodactylus* (Platyhelminthes, Monogenea) da molti anni provocano ingenti danni soprattutto in pesci d’acqua dolce, come *G. salaris* sui salmoni atlantici (*Salmo salar*) del nord Europa, *G. arcuatus* sullo spinarello (*Gasterosteus aculeatus*) e altre specie di minore importanza sanitaria. Sui pesci marini la loro presenza risulta essere più raramente rilevata rispetto a quelli d’acqua dolce. Infatti, delle oltre 400 specie di *Gyrodactylus* spp. finora descritte, solo un centinaio colonizza ospiti d’acqua marina e nessuna di queste, fino ad oggi, risultava segnalata nel Mediterraneo. Il riscontro nel 2005 di episodi di infestazione massiva da girodattili sulla cute e sulle pinne di soggetti giovanili di orata (*Sparus aurata*) allevati intensivamente nel Mar Adriatico assume quindi notevole importanza dal punto di vista sanitario e parassitologico.

In quattro allevamenti situati sulla costa orientale del Mar Adriatico, due in Croazia e due in Albania, si sono registrate a partire da settembre 2005 elevate perdite di soggetti di orata del peso medio di 5 g, con mortalità variabile dal 5 al 20%.

L’infestazione è stata rilevata sia in pesci allevati in gabbie galleggianti sotto costa che in vasche in cemento; i sintomi principali erano rappresentati da ipermelanosi, anoressia, letargia e progressiva perdita di peso. Per ogni allevamento sono stati campionati 20 soggetti che venivano immediatamente eutanassizzati e fissati *in toto* in alcool 70° e/o formalina tamponata 10%. Tutti i pesci venivano poi sottoposti ad esame parassitologico e, fin dalle prime osservazioni con l’ausilio dello stereomicroscopio, si evidenziava la presenza di un elevatissimo numero di monogenei Gyrodactylidae a livello cutaneo. Quaranta parassiti sono stati isolati e montati in fissativo di Malmberg, quindi sottoposti all’identificazione di specie mediante analisi morfometriche effettuate su 25 parametri dell’opisthaptor e, in alcuni casi, microscopia elettronica a scansione (SEM). I dati risultanti dalle misurazioni sono stati quindi analizzati statisticamente e comparati con quelli esistenti nelle banche dati inerenti i parassiti Gyrodactylidae. Porzioni di cute sono state inoltre prelevate dai soggetti fissati in formalina e processate per l’esame istologico.

L’esame parassitologico ha permesso di evidenziare come i girodattili fossero localizzati prevalentemente alla base delle pinne e a livello del cranio, in alcuni casi invadendo l’intera superficie dell’occhio. Il rilevamento delle caratteristiche morfologiche e la loro successiva comparazione con i caratteri di altre specie di *Gyrodactylus* descritte in pesci marini hanno suggerito che possa trattarsi di una nuova specie, anche se ulteriori analisi di tipo molecolare sono necessarie per completarne la descrizione.

In base agli episodi osservati, la girodattilosi dell’orata potrebbe rappresentare un nuovo rischio sanitario per la maricoltura mediterranea. Appare quindi urgente condurre studi sull’origine di questa nuova specie di *Gyrodactylus*, sui suoi eventuali serbatoi naturali, sulle sue caratteristiche biologiche e sulla sua diffusione nei nostri allevamenti.

PLEROCERCOSI DA *DIPHYLLOBOTHRIUM LATUM* (CESTODA, PSEUDOPHYLLIDEA) NEL LAGO DI COMO: AGGIORNAMENTI EPIDEMIOLOGICI

Gustinelli A.¹, Invernizzi S.¹, Romanò C.², Fioravanti M.L.¹

¹Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale, Università di Bologna, Ozzano Emilia (BO); ²Ufficio Caccia e Pesca, Provincia di Como

La plerocercosi sostenuta da *Diphyllobothrium latum* (Cestoda, Pseudophyllidea) è un'importante parassitosi storicamente nota in Italia per le implicazioni zoonosiche che presenta, riconoscendo come ospite definitivo l'uomo ed altri mammiferi e come secondo ospite intermedio diverse specie ittiche. All'inizio del secolo scorso numerosi casi umani di difillobotriosi venivano segnalati nelle zone circostanti i laghi subalpini dell'Italia settentrionale (in particolare i laghi Maggiore ed Iseo); successivamente la patologia sembrava essere quasi scomparsa dal territorio nazionale fino all'ultimo decennio, in cui si è osservata una recrudescenza del problema nella zona del lago di Como, con otto casi umani diagnosticati solo nel 2005. L'anamnesi di questi casi riportava costantemente il consumo di prodotti ittici crudi o poco cotti a base di pesce persico (*Perca fluviatilis*) e lavarello (*Coregonus lavaretus*).

Un'indagine epidemiologica sulla presenza di larve plerocercoidi di *D. latum* in pesce persico, secondo ospite intermedio d'elezione del parassita, è stata effettuata nel corso del 2005: sono state prese in considerazione 5 stazioni di campionamento (Carate Uriò, Domaso, Mandello del Lario, Bellagio, Faggeto Lario) sulle tre branche del lago di Como.

Durante le operazioni di filettatura dei pescatori professionisti locali sono stati esaminati complessivamente 692 filetti di persico mediante osservazione diretta e speratura con l'ausilio di un transilluminatore.

In relazione alle diverse stazioni di campionamento, la percentuale di positività media dei filetti è risultata essere del 14,2% (con valori minimi del 3,9% presso la stazione di Faggeto Lario e massimi del 23,3% nella stazione di Domaso), con un'intensità d'infestazione media di 1,2 parassita/filetto (con valori minimi e massimi rispettivamente di 1 e 3 parassiti/filetto).

In base ai risultati preliminari ottenuti nel corso della prima metà del 2006, su quattro delle cinque stazioni in esame sembra rilevarsi un sensibile aumento della positività per *D. latum* nei pesci persico esaminati. Al momento risultano invece negative le specie *Esox lucius* e *Lota lota*, indicati in bibliografia come ospiti paratenici del parassita in questi ambienti lacustri.

L'indagine epidemiologica in corso sembra evidenziare un'elevata diffusione di *D. latum* nel pesce persico del Lago di Como e offre spunto per alcune riflessioni di ordine epidemiologico.

Il mantenimento, se non addirittura l'amplificazione, della parassitosi nel lago potrebbe essere riferito, oltre che all'elevata prolificità di *D. latum* (un esemplare è in grado di produrre oltre 4 milioni di uova al giorno) ed alla possibile presenza di altri ospiti definitivi meno idonei rispetto all'uomo quali cane, gatto, ecc., alla mancanza di efficacia dei sistemi di depurazione degli scarichi fognari afferenti alle zone lacustri limitrofe alle stazioni di campionamento che hanno mostrato le maggiori prevalenze della parassitosi.

A questo si associa senz'altro un cambiamento delle abitudini alimentari che negli ultimi anni ha comportato un aumento del consumo di preparazioni a base di pesce crudo, quali ad esempio carpaccio di persico o lavarello, con un maggior rischio di assunzione di stadi infettanti vitali del parassita da parte dell'uomo.

Ricerca finanziata con fondi MIUR ex-60%.

REPERTI PARASSITARI IN ELASMOBRANCHI DEL GOLFO DI PALERMO

Castiglione F.¹, Cusimano M.¹, Gustinelli A.², Fioravanti M.L.², Vicari D.¹, Ferrantelli V.¹

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia “A. Mirri”, Palermo; ²Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale, Università di Bologna, Ozzano Emilia (BO).

Le segnalazioni relative alla presenza di elminti in squali dei mari italiani sono piuttosto scarse e relative solo ad alcune specie appartenenti alle famiglie Scyliorhinidae e Squalidae. Poiché nell’ambiente marino gli squali si pongono all’apice della catena trofica, rappresentando ospiti definitivi idonei di parassiti che allo stadio larvale colpiscono i teleostei spesso con rilevanti problematiche di carattere commerciale e sanitario, con il presente lavoro si intende fornire informazioni aggiuntive sulla parassitofauna di alcuni elasmobranchi dei mari italiani.

Nel mese di Luglio 2006 sono pervenute in laboratorio due carcasse di squalo: un esemplare maschio di notidano grigio *Hexanchus griseus* Bonnaterre, 1788 (Famiglia Hexanchidae) (250 cm LT), recuperato da un natante in corso di attività diportistica a circa due miglia dalla costa in località Capo Gallo (Palermo) ed un esemplare femmina di zigrino *Dalatias licha* Bonnaterre, 1810 (Famiglia Dalatiidae) (150 cm LT), rinvenuto in località Arenella nel Comune di Palermo.

Entrambi i soggetti sono stati sottoposti ad esame parassitologico del contenuto gastro-intestinale. Nel soggetto di *H. griseus* sono stati rinvenuti 2 esemplari adulti di trematodi digenei a livello dello stomaco pilorico e 25 esemplari di cestodi Trypanorhyncha nella valvola spirale. In *Dalatias licha* sono stati invece riscontrati 3 esemplari adulti di cestodi Trypanorhyncha a livello della valvola spirale dell’intestino.

I parassiti reperiti sono stati puliti, fissati in alcool etilico 70°, chiarificati in lattofenolo di Amman, quindi sottoposti ad osservazione microscopica e al rilevamento delle caratteristiche morfometriche mediante camera lucida.

I trematodi digenei sono stati identificati come appartenenti alla specie *Otodistomum veliporum* (Famiglia Azygiidae) in base ai caratteri morfometrici, fra cui in particolare quelli relativi alle dimensioni di ventosa orale e *acetabulum*, alla posizione pre-ovarica dei testicoli ed alla dimensione delle uova (40-50×70-80µm). I cestodi Trypanorhyncha riscontrati in *H. griseus* mostravano caratteri tipici della famiglia Grillotiidae, quali la presenza di 2 botridi, un’armatura tentacolare costituita da uncini principali eteromorfi con numerose file di uncini intercalari, una parte bulbare più lunga della parte botridiale e proglottidi acraspedoti con posizione centrale dell’utero.

I cestodi Trypanorhyncha rinvenuti in *D. licha* presentavano invece caratteristiche morfologiche che facevano riferire gli esemplari alla famiglia Sphyricephalidae, soprattutto in rapporto alla morfologia dello scolice (presenza di 2 botridi con evidente cresta mediana longitudinale, morfologia dell’apparato rincheale, disposizione degli uncini di tipo isomorfo nell’armatura dei tentacoli) e delle proglottidi (di forma quadrangolare, craspedoti).

Il presente studio, oltre a voler arricchire le informazioni scientifiche sulla parassitofauna degli squali dei mari italiani, può dare utili informazioni sull’identità degli ospiti definitivi di elminti che vengono frequentemente segnalati allo stadio larvale in teleostei marini. In particolare la presenza di infestazioni massive sostenute da larve di cestodi Trypanorhyncha e da metacercarie di diversi trematodi digenei, oltre a determinare gravi lesioni tissutali e svariate problematiche sanitarie nelle popolazioni ittiche selvatiche, può essere causa di deprezzamento e, talvolta, di esclusione dal commercio dei prodotti ittici parassitati.

METAZOAN PARASITES OF CONGER EEL (*CONGER CONGER* L.) FROM SARDINIAN WATERS (ITALY)

Culurgioni J., D'Amico V., Coluccia E., Mulas A., Figus V.

Dip. Biologia Animale ed Ecologia - Università di Cagliari - Viale Poetto 1, Cagliari

Conger conger L. (Osteichthyes, Congridae) is a benthic species living in rocky and sandy bottoms between 10 and 1000 m. It is widely distributed in the Eastern Atlantic, in the Western Black Sea and it is very common in all the Mediterranean. Its diet is based mainly on Osteichthyes, Crustaceans and Molluscs, with feeding pattern varied in relation to living depth. Studies on its parasitic fauna have been done in different areas of Mediterranean but, to date, there are no detailed reports on its parasite communities in Sardinian waters. This is a first study aimed at characterizing the parasitic fauna of *C. conger* from Sardinian waters. Between March and May 2006, 26 specimens ranging from 39 to 106 cm total length, fished at different depths in the Gulf of Palmas (600 m), Gulf of Cagliari (400 m) and Gulf of Arbatax (40 m) have been examined for parasitic infections. Dissections were performed using standard parasitological techniques. All the parasites were removed, identified according to morphological criteria and counted. Parasite prevalence and its 95% confidence intervals, mean intensity and abundance, listed in Table 1, were calculated. A total of 20 taxa were recorded, of which 13 have been identified to species level. The first results (Table 1) suggest the advisability of widening this research in order to give a correlation between parasite communities, geographical areas, age of hosts and living depth.

<i>Conger conger</i> (26)	Site	P%(CI)	MI±SE	A±SE
Infected		100(87.5-100)	62.23 ± 21.62	62.23 ± 21.62
Infected by:				
Copepoda				
<i>Hatschekia</i> sp.	G	30,8(14,6-51,4)	4.1 ± 1.4	1.2 ± 0.5
Polychaeta				
<i>Ichthyotomus sanguinarius</i>	F	11.5(1.69-29.9)	17.3 ± 16.3	2.0 ± 1.9
Digenea				
<i>Lecithochirium rufoviridis</i>	S	69.2(48.6-85.4)	6.3 ± 2.1	4.4 ± 1.5
<i>Lecithochirium fusiforme</i>	S	42.3(23.8-62.6)	6.8 ± 3.5	2.9 ± 1.6
Hemiuridae sp.	S	26.9(11.7-47.4)	3.0 ± 1.1	0.8 ± 0.4
<i>Proisorhynchus crucibulum</i>	I	30.8(14.6-51.4)	3.7 ± 1.1	1.3 ± 0.5
<i>Proisorhynchus aculeatus</i>	I	26.9(11.7-47.4)	59.0 ± 23.5	15.9 ± 7.9
<i>Dolichoenterum longissimum</i>	S	3.8(0.0-19.4)	1.0	0.04 ± 0.04
<i>Helicometra fasciata</i>	I	3.8(0.0-19.4)	2.0	0.1 ± 0.1
<i>Proctoeces maculatus</i>	I	3.8(0.0-19.4)	13.0	0.5 ± 0.5
Cestoda				
Trypanorhyncha spp. *	I-GB	7.7(0.0-24.9)	5.5 ± 0.5	0.4 ± 0.3
<i>Scolex pleuronectis</i> *	I	34.6(17.6-55.2)	16.5 ± 4.9	5.1 ± 2.1
Tetraphyllidea *	I	38.5(20.6-58.9)	56.0 ± 35.3	21.5 ± 14.2
Nematoda				
<i>Anisakis simplex</i> type I *	S-I	11.5(1.69-29.9)	1.0 ± 0.0	0.1 ± 0.1
<i>Anisakis simplex</i> type II *	I	3.8(0.0-19.4)	1.0	0.04 ± 0.04
<i>Cucullanus bioccai</i>	S-I	46.2(27.0-66.2)	6.3 ± 2.4	2.9 ± 1.3
<i>Cristitectus congeri</i> *	I	7.7(0.0-24.9)	1.5 ± 0.5	0.1 ± 0.1
<i>Hysterothylacium</i> sp. *	VC	61.5(41.0-79.4)	3.3 ± 0.6	2.0 ± 0.5
Nematoda sp. *	I-VC	23.1(9.0-43.3)	1.8 ± 0.4	0.4 ± 0.2
Acanthocephala				
Acanthocephala sp.	I	3.8(0.0-19.4)	1.0	0.04 ± 0.04

* = larval stage; G = gills; F = fins; S = stomach; I = intestine; GB = gall bladder; VC = visceral cavity.

Table 1: Parasites of *Conger conger* from Sardinian waters.

NUOVI DATI SULLA OPISTORCHIASI IN ITALIA

Gustinelli A.¹, Agnetti F.², Latini M.², Ghittino C.², Lovaglio G.³, Natali M.⁴, Fioravanti M.L.¹

¹Dpt. di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale, Università di Bologna, Ozzano Emilia (BO); ² Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Terni; ³ ASL 2, Perugia; ⁴ Ufficio Gestione Fauna Ittica, Provincia di Perugia

Con il termine Opistorchiasi/Clonorchiasi si comprendono importanti patologie parassitarie dell'uomo e di altri mammiferi ittiofagi sostenute da diverse specie di trematodi digenei, fra cui *in primis* *Clonorchis sinensis*, *Opistorchis viverrini* e *O. felineus*. In base a studi recenti circa 17 milioni di persone sarebbero affette da queste parassitosi a livello mondiale. Le prime due specie sono endemiche nel sud-est asiatico, mentre *O. felineus* risulta descritto in Europa orientale e, sporadicamente, in alcuni paesi dell'Europa mediterranea fra cui l'Italia, dove venne segnalato un'unica volta alla fine del XIX secolo nel gatto e nel cane in Toscana. E' apparso quindi di un certo interesse il recente riscontro di alcuni casi di Opistorchiasi umana in Umbria. Fra il 2003 ed il 2005 sono stati infatti descritti 10 casi di infestazione da *Opistorchis* sp. in persone che all'anamnesi riferivano il consumo di tinca, carpa e persico marinati e/o affumicati presso ristoranti siti lungo il litorale del lago Trasimeno (Perugia). Lo studio morfologico delle uova reperite nelle feci dei pazienti permise di identificarle come *Opistorchis* sp., presumibilmente *O. felineus*. Il ciclo biologico di questo parassita prevede quali ospiti definitivi diversi mammiferi ittiofagi, fra cui l'uomo, e due ospiti intermedi, il primo rappresentato da molluschi gasteropodi ed il secondo da numerose specie di pesci dulciacquicoli. Alla luce della mancanza di dati sull'epidemiologia di questo parassita in Italia si è quindi effettuata un'indagine parassitologica volta ad individuare gli ospiti intermedi coinvolti e le dinamiche eco-biologiche che regolano il ciclo del parassita. Nel corso del 2005-2006 sono stati esaminati 222 pesci catturati in diverse zone del lago Trasimeno. In particolare 174 tinche (*Tinca tinca*), 35 pesci persico (*Perca fluviatilis*), 6 persici trota (*Micropterus salmoides*), 6 carassi (*Carassius carassius*) ed 1 soggetto di carpa (*Cyprinus carpio*) sono stati sottoposti ad esame parassitologico volto all'individuazione di metacercarie di *Opistorchis* sp. mediante osservazione mediante stereomicroscopio di porzioni muscolari previo schiacciamento tra due vetri compressori. I parassiti riscontrati venivano isolati e successivamente sottoposti ad osservazione microscopica previa chiarificazione in glicerina. Nello stesso periodo d'indagine sono stati inoltre campionati 200 gasteropodi lungo le sponde del lago. I molluschi sono stati mantenuti in osservazione in laboratorio per 7 giorni a temperatura ambiente in capsule petri contenenti acqua deionizzata per l'eventuale emissione di cercarie, quindi sacrificati e sottoposti ad esame microscopico. L'esame parassitologico delle porzioni muscolari dei pesci esaminati ha portato al rilevamento di numerose metacercarie non vitali ed in fase di regressione in 14 tinche, mentre tutti i soggetti delle altre specie ittiche sono risultati negativi. Solo in una tinca sono state reperite a livello del muscolo laterale due metacercarie vitali le cui caratteristiche morfometriche le hanno fatte riferire ad *O. felineus*. L'esame parassitologico dei gasteropodi ha dato sempre esito negativo. A tal riguardo va però considerato come gli stadi larvali di trematodi digenei siano in genere presenti nelle popolazioni di gasteropodi con percentuali molto basse, rendendo necessario lo studio di un numero molto elevato di molluschi nei diversi momenti stagionali. Infine sono stati condotti esami parassitologici su feci di gatti presenti nelle zone a rischio del lago, riscontrando in un'alta percentuale di soggetti la presenza di uova di digenei Opistorchidae riferibili a *O. felineus*. Sebbene necessitino ulteriori dati sull'esatta identità delle metacercarie reperite in tinca, attualmente in fase di tipizzazione molecolare, e sulla diffusione di *O. felineus* nelle popolazioni di ospiti intermedi, i risultati preliminari di questa indagine confermano la presenza di questo parassita potenzialmente zoonosico sul territorio nazionale ad un secolo dalla sua prima ed unica segnalazione.

PATOLOGIE ED ALLEVAMENTO DELL'OMBRINA BOCCADORO, ARGYROSOMUS REGIUS ASSO 1801

Cherchi S.², Cappuccinelli R.², Angelucci G.¹, Lai M.G.², Giagoni A.¹, Alborali G.L.³, Salati F.¹

¹ Centro per l'Ittiopatologia e l'Acquacoltura, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna, Oristano; ² Gruppo Acquacoltura, Porto Conte Ricerche, Tramariglio (SS); ³ Laboratorio Ittiopatologia, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, Brescia.

Al fine di sviluppare l'allevamento di “nuove specie ittiche”, è stato effettuato uno studio in Sardegna, della durata di 15 mesi, sull'ombrina boccadoro, *Argyrosomus regius* Asso 1801. Lo scopo dello studio è stato quello di paragonare le performances zootecniche e le malattie dell'ombrina allevata in due gabbie galleggianti in-shore ed alimentate con due diete commerciali aventi un diverso rapporto proteine/grassi: mangime A (Proteine totali 43%, Lipidi 19%) e mangime B (Proteine totali 47,0%, Lipidi 14%). A tal scopo, 3700 giovanili di ombrina boccadoro del peso iniziale di 12,8 g sono stati allevati in gabbie galleggianti in-shore poste nel Golfo di Olbia in un impianto in cui, oltre alla coltivazione di mitili, vengono allevate spigole, *Dicentrarchus labrax*, orate, *Sparus aurata*, e saraghi, *Diplodus puntazzo*.

Il risultato finale della sperimentazione ha evidenziato che i pesci presentavano un buon incremento ponderale e, dopo 15 mesi, il peso medio e le lunghezze medie registrate sono state di 869,1 g e 41,7 cm e di 811,8 g e 40,9 cm, rispettivamente nella gabbia A e B. L'indice di conversione dell'alimento è stato di 1,7:1 e di 1,9:1 rispettivamente nella gabbia A e B; mentre la percentuale edibile calcolata a fine sperimentazione è stata del 63,5% e 63,0%. Inoltre, le perdite registrate, rispettivamente del 32,9% e del 32,2%, nelle gabbie A e B, sono state principalmente dovute ai campionamenti effettuati per le biometrie e per i controlli ittiopatologici. Infatti, per quanto riguarda la mortalità, durante l'anno della sperimentazione non sono state registrate morie importanti causate da agenti infettivi. Non sono state segnalate malattie virali e, per quanto riguarda quelle batteriche, è stata riscontrata a più riprese ed in numerosi soggetti la Flexibatteriosi marina, causata da *Tenacibaculum maritimum*. In pochi soggetti sono state evidenziate le lesioni tipiche della Nocardiosi senza tuttavia registrare alcuna mortalità. Nonostante l'alto numero di controlli e campionamenti, anche alla vendita non è stata più evidenziata alcuna lesione da *Nocardia* sp. Inoltre non sono state riscontrate la Vibriosi e la Winter Disease, che hanno colpito le specie ittiche allevate nelle gabbie galleggianti accanto a quelle delle ombrine, né l'Encefalite da Nodavirus. Per quanto riguarda le malattie parassitarie, nonostante la costante presenza di *Atrispinum salpae* e *Ceratomyxa diplodae* nei pesci allevati nelle altre gabbie, non è stata riscontrata alcuna parassitosi nelle ombrine. In conclusione, i risultati ottenuti sottolineano la rusticità di questa specie ittica sia alle malattie che alle condizioni ambientali e, per via delle notevoli performances zootecniche, la propongono quale specie idonea all'allevamento.

OSSERVAZIONI SANITARIE IN SYNGNATHIDAE STABULATI IN CATTIVITA'

D. Florio¹, C. Bombardini¹, M. Caffara¹, M.L. Fioravanti¹, F. Quaglio², L. Fichtel³

¹ Dip. Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale, Università di Bologna, Ozzano Emilia (BO); ²Dip. Sanità Pubblica, Patologia Comparata ed Igiene Veterinaria, Università di Padova, Legnaro (PD); ³Parco Oltremare, Riccione (RN)

Parallelamente al crescente interesse che negli ultimi anni i parchi acquatici hanno rivolto ai pesci appartenenti alla famiglia Syngnathidae, le conoscenze tecnico-scientifiche inerenti la loro biologia, le loro esigenze nutrizionali e la loro gestione in cattività si sono notevolmente ampliate. Nonostante ciò le informazioni sulle principali patologie che possono colpire questi teleostei durante la stabulazione in acquario rimangono piuttosto limitate. Sono stati quindi raccolti i riscontri diagnostici effettuati dal 2004 al 2006 nel corso di episodi di mortalità acuta o cronica registrati nel settore di quarantena e nelle vasche espositive di un parco acquatico nazionale. Sono stati sottoposti ad esami parassitologici, micologici, batteriologici ed istologici complessivamente 90 Syngnathidae, in particolare 67 cavallucci marini (34 *Hippocampus erectus*, 24 *H. abdominalis*, 7 *H. zosterae*, 2 *H. barbouri*), 21 pesci ago (10 *Syngnathus typhle*, 7 *S. scovelli*, 4 *Syngnathoides biaculeatus*) e 2 dragoni marini (1 *Phycodurus eques* e 1 *Phyllopteryx taeniolatus*). Nella tabella seguente vengono schematizzati i principali reperti parassitari, batterici e micotici individuati nel corso del periodo d'osservazione.

REPERTI PARASSITARI, BATTERICI E MICOTICI	<i>H. erectus</i>	<i>H. abdominalis</i>	<i>H. zosterae</i>	<i>H. barbouri</i>	<i>S. typhle</i>	<i>S. scovelli</i>	<i>S. biaculeatus</i>	<i>P. eques</i>	<i>P. taeniolatus</i>
Peritrichi sessili	10	-	-	-	-	4	1	-	-
Scuticociliatida	-	-	-	-	-	-	1	1	1
Microspora	2	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Gyrodactylus</i> sp.	-	-	-	-	8	2	-	-	-
<i>Vibrio</i> spp.	7	9	4	2	-	5	-	-	-
<i>Aeromonas</i> spp.	6	-	-	-	-	4	-	-	-
<i>Tenacibaculum maritimum</i>	-	-	-	-	8	-	-	-	-
<i>Mycobacterium</i> spp.	9	-	-	-	9	1	1	-	-
<i>Tsukamurella paurometabola</i>	-	-	-	2	-	-	-	-	-
<i>Cladosporium</i> spp.	1	-	4	1	-	-	-	-	-

Fra i reperti parassitari assumono particolare interesse i ciliati istiofagi dell'ordine Scuticociliatida, isolati da 3 soggetti che presentavano estese lesioni cutanee, ed i trematodi monogeni del genere *Gyrodactylus*, reperiti con intensità d'infestazione molto elevata in 10 soggetti di *S. typhle* e *S. scovelli* e le cui caratteristiche morfologiche sembrano indicarne l'appartenenza a nuove specie. In alcuni soggetti sono stati osservati anche amebe e flagellati del genere *Ichthyobodo* a livello branchiale, ma senza rilevare alcun sintomo/lesione riferibile alla presenza dei parassiti. In 3 soggetti provenienti da ambiente selvatico sono stati reperiti stadi larvali ed adulti di trematodi digenei e cestodi, da considerarsi riscontri occasionali e di scarso interesse ittiopatologico. Fra i reperti batterici, nel periodo d'indagine sono stati isolati con maggiore frequenza *Vibrio* spp., in particolare *V. alginolyticus*, e *Mycobacterium* spp. Nel primo caso si è trattato di isolamenti condotti spesso in corso di altre patologie (Scuticociliatosi, malattia da gas, ecc.), nel secondo di isolamenti effettuati da animali stabulati nel settore di quarantena e che mostravano chiari segni di debilitazione a seguito delle operazioni di trasporto e di adattamento. In alcuni soggetti di cavallucci marini sono state inoltre osservate alcune patologie di origine metabolica (iperplasia tiroidea) ed ambientale (malattia da gas). In linea generale i risultati di quest'indagine hanno mostrato il frequente riscontro di agenti patogeni opportunisti/facoltativi (ciliati peritrichi sessili, Scuticociliatida, *Vibrio* spp., *Aeromonas* spp., *Mycobacterium* spp., *Cladosporium* spp.) ed alcune patologie di origine metabolica, ad indice dell'importanza di ottimizzare le procedure di quarantena, di controllo sanitario e di "buon management" al fine di prevenire le più comuni malattie dei Syngnathidae in cattività.

INFEZIONE DA SAPROLEGNACEAE IN GAMBERI DI FIUME *AUSTROPOTAMOBIVUS PALLIPES* COMPLEX IN UN ALLEVAMENTO SPERIMENTALE DEL NORD ITALIA

Quaglio F.¹, Galuppi R.², Capovilla P.³, Santoro D.⁴, Bonoli C.², Marcer F.⁵, Tampieri M.P.²

¹Dipartimento di Sanità Pubblica, Patologia Comparata ed Igiene Veterinaria, Università di Padova, Legnaro (PD); ²Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale, Università di Bologna, Ozzano Emilia (BO); ³Libero Professionista, Belluno; ⁴Dipartimento di Scienze degli Alimenti, Università di Bologna; ⁵Dipartimento di Scienze Sperimentali Veterinarie, Università di Padova, Legnaro (PD)

Il gambero di fiume *Austropotamobius pallipes* complex, specie indigena europea, è oggetto di tutela in quanto considerato a rischio di estinzione. L'assenza o la limitata presenza dei gamberi fluviali autoctoni costituisce innanzitutto una grave mancanza in termini di biodiversità e rappresenta anche una grave perdita per le comunità macrozoobentoniche fluviali. Al fine di preservare questi crostacei minacciati sono essenziali rigorosi piani di ripopolamento, pertanto la messa a punto di tecniche di allevamento è necessaria per la produzione, in cattività, di stadi giovanili e crostacei adulti da reintrodurre in ambiente naturale. In una troscoltura di un centro di acquacoltura del Nord Italia, nel periodo compreso tra autunno 2004 e autunno 2005 è stata condotta una prova sperimentale di allevamento intensivo di *A. pallipes* complex. Nell'ottobre del 2004, sono stati pescati 32 gamberi (15 maschi e 17 femmine) nella roggia tributaria dell'allevamento. Gli animali sono stati stabulati prima in una vasca di cemento poi in una di vetroresina di dimensioni 1m x 1m con acqua profonda 30 cm, a lento ricambio. In aprile le femmine con uova (11 individui), sono state stabulate in una vasca californiana per l'incubazione delle uova di salmonidi. La temperatura dell'acqua nel corso dell'esperimento è variata tra un minimo di 4°C, in inverno, e un massimo di 12°C, in estate. Tutti i soggetti venivano alimentati, per due volte a settimana, con porzioni di muscolo di trota.

Nel giugno 2005, nel giro di pochi giorni si è verificata una moria totale dei gamberi nella vasca in vetroresina, che presentava problemi igienici per la permanenza di materiale in decomposizione. Nel mese di agosto le femmine rimanenti, in seguito alla schiusa delle uova, sono state spostate in una vasca simile a quella in cui si è verificata la mortalità. Dopo circa due settimane anche questi gamberi morivano, presentando muscolatura flaccida con presenza di ife fungine a livello delle giunzioni del carapace. Gli stadi giovanili (150 soggetti) rimasti nelle vasche californiane, in periodo di circa 2 mesi si sono ridotti a 32 a causa dell'intenso cannibalismo. Complessivamente 23 gamberi sono stati sottoposti ad esame microscopico a fresco, micologico, batteriologico ed istopatologico. All'esame micologico sono state isolate Saprolegniaceae da branchie, zampe e addome di tutti i campioni, e *Fusarium* sp. in un solo esemplare. L'esame batteriologico ha evidenziato polimicrobismo aspecifico. All'esame istologico si osservava un'abbondante presenza di ife fungine ramificate nelle branchie, nello spessore dei gonopodi, nella porzione ventrale del carapace addominale molle (Sternum) e nelle giunzioni delle articolazioni, con gravi lesioni all'ipoderma, reazioni flogistiche e necrosi, talvolta accompagnate da infiltrazione di cocci e bacilli. La muscolatura e la ghiandola verde talvolta risultavano colonizzate. In alcuni casi le ife si presentavano incapsulate da melanina. Batteri filamentosi erano presenti sulla cuticola dell'esoscheletro. e *Cothurnia sieboldi* (Ciliophora, Peritrichia) nelle branchie e sull'esoscheletro. La mortalità è stata attribuita ad una massiva infezione da Saprolegniaceae, sviluppatasi in maniera abnorme a causa della mancata rimozione dei residui di alimento.

RISULTATI PRELIMINARI SUI POSSIBILI EFFETTI TOSSICI DI MANGIMI ARRICCHITI IN SELENIO SUL GAMBERO ROSSO AMERICANO (*PROCAMBARUS CLARKII*)

Elia A.C.¹, Dörr A.J.M.¹, Abete M.C.², Taticchi M.I.¹, Pacini N.¹, Natali M.³, Troni V.¹, Prearo M.²

¹ Dipartimento di Biologia Cellulare e Ambientale, Università di Perugia, Perugia; ² Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino; ³ Provincia di Perugia

Il selenio, metallo essenziale per gli organismi, presenta una tossicità sugli stessi a concentrazioni elevate; a tutela della salute perciò esistono dei limiti di legge per la presenza di selenio nei mangimi. Il presente studio ha l'obiettivo di valutare i livelli di bioaccumulo e la variazione di enzimi antiossidanti su esemplari di gambero rosso americano (*Procambarus clarkii*) alimentati con una dieta arricchita in selenio. Tale ricerca sorge anche dalla necessità di ottenere dei dati sui mangimi utilizzati in acquacoltura, che presentano un'alta percentuale di proteine di origine ittica e variamente addizionati con oligoelementi, onde ottenere delle valutazioni oggettive sulle potenziali azioni nocive e per raggiungere migliori rese della produttività ittica. A tale scopo esemplari giovani ed adulti di entrambi i sessi sono stati alimentati con due diverse diete commerciali: una dieta standard con un livello basso di selenio (0,30 mg/kg) e una con un più alto livello di metallo (1,21 mg/kg). La composizione protidica e lipidica delle due diete era simile (47% e 20% rispettivamente, con una percentuale del 45% circa di farina di pesce) e la differenza era data dalla diversa concentrazione di selenio. Settecento gamberi sono stati prelevati vivi dalla Cooperativa dei Pescatori del lago Trasimeno (PG). Sono stati ripartiti in otto vasche; 4 vasche sono servite da controllo (femmine e maschi giovani, femmine e maschi adulti) e le altre 4 per i soggetti alimentati con il mangime a più alto livello di selenio (maschi e femmine giovani, maschi e femmine adulti). Gli esemplari sono stati acclimatati per 15 giorni nelle stesse vasche alimentate con acqua di lago a flusso continuo. Ogni vasca è stata dotata di rifugi, costituiti da mattoni forati, in modo tale da eliminare fenomeni aggiuntivi di stress per i soggetti stabulati. La sperimentazione è stata condotta per 50 giorni ed i due mangimi, costituiti da pellets di circa 1,6 mm, sono stati somministrati *ad libitum* giornalmente; il mangime non consumato veniva rimosso dalla vasca tramite sifonamento. I parametri chimico-fisici (pH, temperatura, ossigeno e conducibilità) sono stati monitorati giornalmente in tutte le vasche ed i fenomeni di morte e di muta sono stati registrati regolarmente. Dieci esemplari sono stati prelevati per ogni vasca e sacrificati a 15, 30 e 50 giorni. Sui tessuti di ogni singolo individuo (epatopancreas, branchie, muscolo e carapace) sono stati valutati i tenori di selenio accumulato e l'attività enzimatica relativa agli enzimi glutazione perossidasi selenio-dipendente, catalasi, glutazione reduttasi e glutazione S-transferasi.

I risultati preliminari qui prodotti, riguardano solamente i livelli riscontrati nell'epatopancreas degli esemplari adulti (maschi e femmine) alimentati con la dieta arricchita in selenio per 15 giorni ed i rispettivi controlli negativi; tali dati hanno evidenziato delle differenze statisticamente significative nella concentrazione di selenio (aumento) e nell'attività enzimatica di glutazione perossidasi selenio-dipendente (diminuzione) negli esemplari maschi; nelle femmine invece tale variazioni nel primo periodo considerato non è apparsa significativamente diversa. Da tali dati, elaborati per ora solamente sull'epatopancreas, si dovrà ottenere conferma valutando i risultati ottenuti nei tempi successivi di campionamento, cercando una possibile correlazione anche con i dati ottenuti dai soggetti giovani. La diversa risposta ottenuta nei due sessi può far ritenere un possibile diverso effetto tossicologico del selenio, maggiormente evidenziabile nei soggetti maschi.

ATTIVITA' TOSSICA E CANCEROGENA DI AFLATOSSINA E FUMONISINA SU UOVA EMBRIONATE DI TROTA IRIDEA (*ONCORHYNCHUS MYKISS*)

Minervini F.¹, Mutinelli F.², Brunetti R.³, De Girolamo A.¹, Vascellari M.², Prearo M.³

¹ CNR - Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari, Bari; ² Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro (PD); ³ Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino

Le micotossine sono contaminanti di origine fungina frequentemente presenti in alimenti destinati all'uomo e agli animali; molte di esse possono essere potenzialmente cancerogene, mentre alcune presentano una riconosciuta attività cancerogenetica. Possono essere presenti negli alimenti sia singolarmente, sia come miscele. In base alle informazioni bibliografiche, la trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*) rappresenta una specie molto sensibile alle sostanze cancerogene; inoltre l'incidenza di tumori spontanei epatici riscontrata in tale specie ittica risulta essere molto bassa (0,1%); per tali motivi questa specie animale viene spesso utilizzata come modello sperimentale in studi di cancerogenicità. Tali studi possono essere realizzati sia con le classiche prove di somministrazione dei tossici attraverso l'alimento, sia utilizzando le uova embrionate. L'utilizzo di quest'ultimo modello sperimentale garantisce, con un'unica dose, un'uniforme esposizione passiva di molte uova ai tossici, l'utilizzo di una ridotta quantità di sostanze pericolose ed un sicuro smaltimento dei cancerogeni. In questa sperimentazione si è voluto utilizzare il biosaggio su uova embrionate di trota iridea per valutare l'attività tossica e cancerogena dell'aflatossina B₁ (AFLB₁) e fumonisina B₁ (FB₁), frequentemente presenti in combinazione negli alimenti. L'attività cancerogena dell'AFLB₁ è nota da tempo, mentre l'azione tossica della FB₁ nella trota iridea e in altre specie ittiche è stata valutata tramite la somministrazione orale, ma mai impiegando il modello sperimentale delle uova embrionate.

Dodici aliquote da 200 uova embrionate di trota iridea ciascuna, sono state trattate per la sperimentazione con un'esposizione di un'ora alle sostanze da testare: 3 aliquote sono state trattate con tre differenti concentrazioni di AFLB₁ (rispettivamente 50, 25 e 5 µg/ml), altre 2 aliquote con diverse concentrazioni di FB₁ (2,5 e 0,5 µg/ml), 5 aliquote con cinque differenti concentrazioni di AFLB₁+FB₁ in associazione (rispettivamente 50+2,5, 25+2,5, 25+0,5, 5+2,5 e 5+0,5 µg/ml) ed infine 2 aliquote trattate rispettivamente con soluzione fisiologica ed etanolo (sostanza utilizzata per la dissoluzione delle micotossine), quali controlli negativi.

Dopo 16-18 mesi le trote sopravvissute sono state sacrificate e sottoposte a necropsia e sui fegati e reni è stato condotto l'esame istopatologico. Il grado di sopravvivenza delle trote è stato valutato dopo 1 e 18 mesi dalla schiusa. Dopo un mese dalla schiusa, la miscela AFLB₁+FB₁ a concentrazione più elevata (50+2,5 µg/ml) ha determinato il più basso grado di sopravvivenza (56%), mentre l'esposizione alle singole micotossine non ha causato significative variazioni rispetto ai controlli (80%). Dopo 18 mesi, si è osservato un grado di sopravvivenza dose-dipendente per tutti i livelli di micotossine testati. In particolare la sopravvivenza è stata dell'11-30% per le singole micotossine e del 12-47% per le miscele, valori nettamente inferiori a quelli ritrovati nei controlli negativi (81%). All'esame istopatologico si è osservata una elevata frequenza di steatosi epatica, sia nei soggetti esposti a AFLB₁, sia in quelli esposti a FB₁. In tutti i soggetti esaminati il rene non ha presentato lesioni. L'esposizione a 25 µg/ml di AFLB₁, in forma singola o combinata, ha determinato lo sviluppo di epatomi con un'incidenza compresa tra 8 e 10%, mentre la FB₁ non ha mostrato un'attività "starter" a tutti i livelli testati. La bassa incidenza di tumori osservati, probabilmente correlata con l'elevata mortalità intermedia, non ha permesso di confermare l'attività "promoter" della FB₁, già riportata in letteratura.

**ARCHEOLOGIA ITTIOPATOLOGICA (DA UNA SEGNALAZIONE DEL 1924):
SOPRA UNA GRAVE EPIZOOZIA DI LUCCI**

Vanelli M.

FATRO S.p.A., Ozzano Emilia (BO)

Dal casuale sfogliare la raccolta della rivista “La Nuova Veterinaria” del 1924, è spuntata una segnalazione, firmata dal Prof. Vittorio Ronca (Direttore Incaricato dell’Istituto di Anatomia Patologica Veterinaria della Regia Università di Modena), relativa ad una moria di lucci (*Lucius vorax*) verificatasi nel mese di marzo di quell’anno nei laghi di Mantova, con una mortalità del 50-60%. Da alcuni soggetti morti è stato isolato un microrganismo, ritenuto responsabile della mortalità, che però non è stato identificato.

Da questa lettura è scaturito il desiderio di “completare” la segnalazione, identificando il microrganismo in questione sulla base dei reperti anatomo-patologici, ampiamente descritti, e delle analisi batteriologiche eseguite dal Prof. Ronca.

I metodi di analisi batteriologica, tuttavia, hanno richiesto ulteriori ricerche su testi di malattie infettive o di microbiologia d’epoca per chiarire il significato di termini quali:

- metodo De Rossi per dimostrare le ciglia;
- crescita in brodo Martin;
- sviluppo in piastre Drigalski-Conradi;
- reazione all’indolo con metodo Morelli;
- metodo Tarozzi per lo sviluppo degli anaerobi;

ed altri, che, a distanza di anni, risultano di non immediata comprensione.

In base a quanto riportato dal Prof. Ronca (che si era riservato di eseguire ulteriori ricerche per una possibile classificazione del germe), si ritiene che il microrganismo responsabile dalla moria dei lucci mantovani di oltre 80 anni fa appartenga alla famiglia delle Enterobacteriacee.

IL SISTEMA IMMUNITARIO DEI TELEOSTEI

Scapigliati G.

Facoltà di Agraria, Università degli Studi della Tuscia, Viterbo

Al presente, i pesci ossei in acquacoltura sono un soggetto indispensabile per ricerche di biologia sperimentale, in quanto sono utilizzati come modelli animali per studi che riguardano biotecnologie, salute umana, ambiente. Il sistema immunitario è uno dei soggetti principali degli studi effettuati sulle specie in acquacoltura, in quanto i risultati di tali studi possono avere ricadute fondamentali per la salute delle specie allevate. Un sistema immunitario efficiente è un prerequisito fondamentale per il mantenimento della salute di una specie marina sia in ambiente selvatico che di allevamento. Quando le condizioni ambientali lo permettono, il diffondersi di patologie batteriche e virali può portare alla distruzione di interi stock ittici. È stato ampiamente riportato che in acquacoltura i fenomeni di stress derivanti da parametri biotici e abiotici rendono le specie allevate più sensibili al diffondersi di patologie.

La vaccinazione e la selezione di pesci più resistenti ai patogeni ed allo stress sembrano al momento le strategie migliori per avere il rapporto costo/beneficio più basso possibile sia per la gestione dell'acquacoltura che della difesa dell'ambiente e del consumatore. Il nostro gruppo di ricerca è da tempo impegnato nella ricerca e realizzazione di marcatori per cellule e molecole immunomodulatorie di spigola e orata in modo da conoscere nel maggior dettaglio possibile le reazioni immunitarie a livello cellulare e molecolare di queste specie contro vibriosi, pasteurellosi e nodaviosi in modo da poter migliorare le tecnologie di vaccinazione e di selezione genetica. Nonostante lo straordinario progresso delle conoscenze riguardo il clonaggio nei pesci teleostei di geni omologhi a quelli dei mammiferi e codificanti per molecole immunomodulatorie, al presente la spigola rappresenta l'unico modello di teleosteo marino per il quale siano disponibili marcatori cellulari e molecolari per lo studio di reazioni immunitarie in vitro ed in vivo. L'elenco dei marcatori al momento disponibili comprende anticorpi monoclonali contro linfociti T e B, immunoglobuline, complemento (C3), sonde genetiche per recettori di superficie dei linfociti e per molecole coinvolte nei meccanismi di riconoscimento e di segnalazione. Tali marcatori hanno permesso di studiare le risposte immunitarie della spigola nei confronti di batteri quali *Vibrio anguillarum* e *Photobacterium damsela*, e nei confronti di antigeni sintetici, in varie condizioni sperimentali ed ambientali.

Sono attualmente in corso ricerche per studiare le risposte della spigola nei confronti di nodaviosi.

STRATEGIE DI CONTROLLO DELLE MALATTIE INFETTIVE IN ACQUACOLTURA CON PARTICOLARE RIFERIMENTO ALLE RHABDOVIROSI DEI SALMONIDI

Bovo G., Gatti F., Lorenzi M., Toller G.

Centro di Referenza Nazionale per l'Ittiopatologia, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie – Legnaro (PD)

Le malattie infettive costituiscono in acquacoltura, come in altre attività zootecniche, una delle principali cause di perdita economica, in grado talvolta di condizionare l'economia aziendale.

In particolare le patologie di origine virale, rappresentano spesso veri e propri flagelli per alcune realtà, come ad esempio la White Spot Syndrome (WSS) che, alla fine degli anni '90, ha causato il collasso della gambericoltura in Ecuador; l'anemia infettiva del salmone (ISA) in grado di mettere in ginocchio la giovane industria del salmone nelle isole Farøer; l'Herpesvirus della carpa Koi che sta causando perdite significative non solo nelle carpe Koi, allevate per fini ornamentali, ma anche nelle carpe comuni che, in molti Paesi soprattutto del sud-est Asiatico, contribuiscono, in misura fondamentale, all'apporto alimentare proteico di quelle popolazioni. Nel nostro territorio l'esempio più eclatante, anche se limitato economicamente in valore assoluto, per la limitata dimensione della specifica realtà, è senz'altro quello rappresentato dalla iridovirus del pesce gatto (ECVD), *Ictalurus melas*, che ha compromesso, forse definitivamente, l'allevamento di questa specie, un tempo allevata senza alcuna difficoltà.

In genere, al loro primo apparire le patologie primarie, si manifestano causando perdite ingenti talvolta drammatiche che, nel volgere di qualche stagione, tendono a ridimensionarsi in termini di mortalità e stabilizzarsi, se non opportunamente contrastate, in forma endemica manifestando episodi ciclici di recrudescenza, in coincidenza di fattori predisponenti fondamentalmente di tipo ambientale e, probabilmente, anche per selezione di ceppi di maggior virulenza.

In trotiltura, l'esempio maggiormente rappresentativo di questa situazione, è costituito dalle rhabdovirus dei salmonidi ovvero, la setticemia emorragica virale (VHS) e la necrosi ematopoietica infettiva (IHN). Queste due gravi patologie, oltre al danno economico diretto che possono causare in allevamento, per le perdite spesso elevate, sono legate anche ad una serie di normative sanitarie che, in termini pratici, limitano le possibilità di mercato per le aziende colpite. Per tali motivi si rende necessario individuare le potenziali strategie di contrasto e scegliere la più idonea.

Purtroppo non è assolutamente facile decidere quale sia la strategia migliore da adottare; le realtà produttive si collocano in un ventaglio di tipologie significativamente diverse tra loro e, quella che può essere ritenuta la strategia ottimale per una azienda, può non essere consigliata per altre.

La dislocazione geografica, il regime termico, le diverse specie allevate, la tipologia e la consistenza del rifornimento idrico, costituiscono i principali parametri in grado di indirizzare la decisione in un senso piuttosto che in un altro, decisione che deve maturare dal confronto dei singoli allevatori per decidere, unitariamente, se optare per la convivenza con la malattia oppure attivare una forma ufficiale di lotta. A questa prima conclusione si dovrebbe pervenire facilmente, dopo un'attenta analisi economica che tenga conto di tutti gli elementi caratterizzanti i possibili scenari.

La convivenza con la malattia rappresenta probabilmente la soluzione più facile da adottare, generalmente è giustificata dalla presenza di perdite limitate o comunque economicamente

sopportabili, come nella maggior parte delle aziende caratterizzate da un regime termico elevato per buona parte dell'anno .

La scelta di attivare un programma di lotta rappresenta invece una decisione molto difficile e determinata che presuppone la piena conoscenza dei danni causati dalla malattia e la convinzione di poterla eliminare. Il singolo allevatore, salvo particolari situazioni, tipiche dalle aziende isolate e rifornite di acqua sorgiva, non è in grado di sostenere da solo questi programmi, cui devono contribuire, con una forte collaborazione, tutti gli allevatori coinvolti, i servizi veterinari locale e centrale ed il laboratorio di riferimento, oltre ad altri enti come i servizi forestali, le province e le associazioni di pesca sportivi. Ognuna di queste figure deve agire in piena sintonia con le direttive impartite, avendo come obiettivo comune l'individuazione ed eliminazione dei focolai d'infezione presenti nel territorio.

Non vi è dubbio che questi programmi di lotta siano particolarmente difficili ed onerosi e non scevri da rischi di reinfezione, tanto più elevati quanto più diffuse sono queste malattie nel territorio circostante. E' necessario ribadire comunque che, in linea di massima, gli sforzi sostenuti vengono in breve compensati, dopo l'eliminazione delle patologie, dalla forte riduzione delle mortalità e delle spese indotte nonché dalla completa apertura dell'azienda risanata, a tutti i mercati. Purtroppo la mancanza di un vaccino commerciale contro le rhabdovirosi dei salmonidi, limita significativamente le possibili strategie d'intervento, per cui l'unico programma di controllo attuabile oggi, non può che basarsi esclusivamente su un'azione di profilassi diretta, tramite eradicazione degli agenti patogeni dalle singole aziende e da tutto il territorio coinvolto nel programma.

Con riferimento alla disponibilità di un vaccino, nei confronti di VHS ed IHN, argomento che verrà illustrato in modo specifico ed esaustivo nelle prossime relazioni di questa tavola rotonda, è necessario sottolineare l'estrema difficoltà di poter ottenere un prodotto commerciale efficace. Infatti, malgrado da molti anni si siano avviati diversi progetti di ricerca e che le principali industrie farmaceutiche del settore, mosse da indubbi interessi di mercato, abbiano intrapreso numerose iniziative per la produzione di prodotti commerciali, è disponibile oggi un unico vaccino contro la IHN dei salmoni registrato ed utilizzato in Canada.

AVAILABILITY OF VACCINES FOR RAINBOW TROUT, AND SOME NORWEGIAN EXPERIENCES ON VACCINATION IN THE AQUACULTURE INDUSTRY

Midtlyng P.J.

VESO (Centre for Veterinary Contract Research and Commercial Services, Ltd); PO Box 8109 Dep. 0032 Oslo, Norway

A world-wide survey among fish health experts conducted in 2003 revealed that vaccines against 15 different bacterial fish diseases were available. At least 7 of these diseases (classical Vibriosis, Furunculosis, Yersiniosis, Streptococcosis, Lactococcosis, Piscirickettsiosis and Bacterial Kidney Disease) are known to affect farmed rainbow trout. The number of vaccines against viral diseases is far less and only vaccines against Infectious Pancreatic Necrosis (IPN) are available in some European countries whereas vaccine against Infectious Haematopoietic Necrosis (IHN) and Infectious Salmon Anaemia (ISA) is available in Canada. There is, however on-going research on Viral Haemorrhagic Septicaemia (VHS) and Salmon Pancreas Disease vaccine, both of which may become of importance to European rainbow trout farming in the future.

According to the expert opinion of the 2003 survey participants, the efficacy of classical Vibriosis and Yersiniosis vaccines was generally very good, whereas Furunculosis vaccines were judged of good efficacy. There were few responses on the efficacy of vaccination against Piscirickettsiosis and BKD. Data allowing for assessment of the efficacy of these vaccines will be presented and discussed during the oral presentation.

In order for vaccination to become a successful tool in preventing disease, vaccination schemes fitting with the specific needs and requirements of each production segment of the aquaculture industry must be developed. This includes the availability of an adequate range of monovalent or combination products for administration by immersion, injection or orally. Examples of current vaccination schemes and their place in the total health management of Norwegian rainbow trout farming will be presented.

Northern European experience shows that immunoprophylaxis is clearly the single most important factor to reduce antibiotic use in aquaculture, which possesses an inherent risk for development of resistant bacteria and the discovery of residues, with corresponding food scandals and poor press coverage. Increasing the use of vaccination is therefore a long-term strategy for maintaining and strengthening every aquaculture production. Some activities that contributed to the rapid increase in Norwegian fish vaccination will be discussed and proposed towards Italian and European rainbow trout aquaculture.

VACCINATION AGAINST VHS IN RAINBOW TROUT: EXPERIMENTAL TESTING AND PERSPECTIVES RELATED TO PRACTICAL FISH FARMING

Lorenzen N.

Danish Institute for Food and Veterinary Research, Århus, Denmark.

European production of farmed rainbow trout frequently encounters considerable problems with diseases caused by viruses. No treatment is available, and with few exceptions, this also counts for vaccines. One of the most important diseases is caused by the Rhabdovirus Viral Haemorrhagic Septicaemia Virus (VHSV). Outbreaks of VHS can result in very high mortality among rainbow trout of all sizes, and the only available control measure is presently stamping out of infected farms in combination with intensive surveillance and control programmes.

Killed and attenuated virus can be used for vaccination, but is expensive to produce or not suitable for use under field conditions respectively. A new and promising prototype DNA vaccine against VHS in rainbow trout has recently been developed. The purified vaccine is non-infectious and cannot replicate in the fish. Upon intramuscular injection, a single vaccine dose can provide high, rapid and long lasting protection of rainbow trout fingerlings against VHS under experimental conditions (Fig. 1).

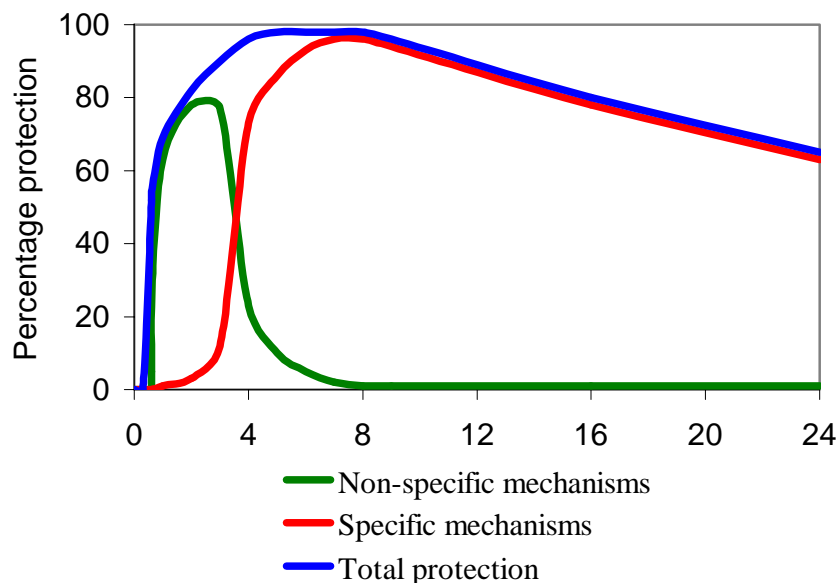


Fig. 1 - The diagram below illustrates how the protection induced by DNA vaccination against VHS and IHN in rainbow trout is a combination of rapidly activated general anti-viral mechanisms followed by more slowly induced specific and long-lasting immunity.

The vaccine could be a valuable tool for reduction of losses caused by the virus under farming conditions. This includes not only regular use as prophylaxis against mortality in endemic zones but also transient use in connection with eradication programmes where

stocking with vaccinated fish in exposed areas one or two seasons prior to disinfection of the farms could help to reduce circulating amounts of virus. Although development of DNA vaccines have been attempted for a number of pathogens in a number of different fish species, the DNA vaccines against salmonid rhabdoviruses such as VHSV remain the most efficient and also the most extensively analyzed to date. The vaccines are highly efficacious under a variety of experimental conditions including different fish life stages, different salmonid host species, and against challenge with different virus strains

A preliminary testing of the VHS DNA vaccine under field conditions has recently been conducted in Denmark. The fish were vaccinated during the winter at farms without VHS and were transferred to net-pens on farms with ongoing VHS outbreaks. The results of the experiments will be summarized.

As with other types of vaccines, a number of safety aspects must be considered in relation to DNA vaccines. Since DNA vaccines are produced by molecular biotechnology, their use in fish and other husbandry animals require acceptance not only by the authorities but also by the consumers in general. These aspects will shortly discussed.

Reference:

Lorenzen N., Lorenzen E., Einer-Jensen K. & LaPatra S.E. (2002). - DNA vaccines as a tool for analyzing the protective immune response against rhabdoviruses in rainbow trout. *Fish Shellfish Immunol.*, 12: 439-453.

VACCINATION AGAINST INFECTIOUS HEMATOPOIETIC NECROSIS (IHN)

LaPatra S.E.

Research Division - Clear Springs Foods, Inc.; Buhl, Idaho 83316 USA

Viral immunity and vaccine strategies designed to prevent or minimize the impact of diseases in intensive salmon and trout culture is intricate work requiring integration of biological and economic variance. These elements can be analyzed scientifically from a basic or applied approach with the latter approach being a conduit for the third element, the production, commercialization and use of the product to improve fish health. It is difficult to discern and integrate these elements during preliminary investigations, but for clarity it is useful to understand which stage of scientific research is being addressed by a particular experiment or experimental outline. Basic viral vaccine research in finfish aquaculture should not necessarily require a motive such as the development of a commercial product. Without this limitation, research continuity could be attained resulting in a deeper understanding of the host-pathogen interaction and the development of effective control strategies.

The process of vaccine research and development requires that the effect of an immunomodulator on viral pathogenesis can be measured experimentally. The performance of a vaccine or therapeutant is determined by measuring its potency, efficacy and safety performance using a well-defined experimental model system. A model system requires an understanding of the dynamics of interaction between the host, pathogen and environment. Points to consider when developing a model system include host range and susceptibility, virus strain characteristics, route and entry and progression of disease, virus load, water temperature and other environmental variables, as well as fish size, age and life stage. A well-characterized model system has been developed for Infectious Haematopoietic Necrosis (IHN) virus, a pathogen of salmon and trout and a member of the family *Rhabdoviridae* and the genus *Novirhabdovirus*. The disease is most acute in young fry and mortalities can be as high as 100% in a given population. IHN virus infection progresses from two major sites of entry: from the gills to the circulatory system and from the oral cavity to the gastrointestinal tract and into the circulatory system. Roughly 3-5 days after exposure, IHN virus is found in virtually every tissue resulting in an acute systemic infection with the epizootic period occurring between 6-14 days. The sequelae suggests that targeting innate or acquired immune effectors that disrupt the virus at primary sites of replication would be an extremely effective control strategy. In addition, pre-existing antibodies could be effective in preventing viremic spread to sites distal from primary infection.

It is not necessary to understand the mechanism or the identity of the effectors that mediate immunity upon treatment with a therapeutant or vaccine. As a result, there is much more information available about activators rather than effectors of the fish immune response. For IHN virus, the G protein is the single viral protein that is necessary and sufficient for eliciting an IHN virus protective immune response in fish. Rhabdovirus G proteins form membrane-anchored, extracellular spikes that coat the surface of the 60-85 nm x 180 nm virus particle. The IHN virus G protein is composed of 488 amino acids; a 20 amino acid signal sequence is removed from the N-terminal sequence during protein maturation. The IHN virus G protein, like other Rhabdovirus G proteins, is an integral membrane protein. It is believed to be a homotrimer that protrudes from the virion particle, binds cell surface receptors and facilitates entry into the host cell. The G protein of *Novirhabdoviruses* contains conserved cysteines that form six extracellular disulfide bonds, the position of the bonds being distinct from those found in the G protein of other rhabdoviruses. IHN virus G protein amino acids involved in virus neutralization have been mapped using a panel of 12 neutralizing monoclonal

antibodies. Comparison of amino acid changes in the G protein of monoclonal antibody escape mutants with wild-type virus, led to the discovery of two primary antigenic sites composed of linear and discontinuous epitopes. Carbohydrate antigens are not involved in the binding of the monoclonal antibodies. Antigenic site 1, amino acids 230-231, is a conformation dependent epitope that does not react with monoclonal antibodies when the glycoprotein is analyzed under reducing conditions. Antigenic site 2, amino acids 272-276, is composed of a linear and a discontinuous epitope and is the major neutralizing epitope of IHN virus. The discontinuous epitope in antigenic site 2 may possibly interact with amino acids 78-81 via a folded loop structure on individual glycoprotein monomers.

Vaccines and thereputants for the control of IHN virus can elicit a potent immunoprotective response in trout and salmon resulting in sterilizing immunity. Attenuated, killed, recombinant, peptide and DNA vaccines have been investigated for the control of IHN virus. Compounds that act as immune-modulators, such as double stranded poly I:C RNA, ISCOMS and recombinant human interleukin 2 have been tested for their ability to elicit an antiviral state in fish. In addition, passive immunization, probiotics, antiviral drugs and adjuvants as well as co-infection with avirulent heterologous virus has been evaluated as a control method. The studies have established that IHN virus vaccine(s) can protect fish against IHN disease with varying degrees of success, that protection involves activation of select effectors of the immune system and that the antiviral state may be established soon after vaccination and last for a considerable length of time.

THE USE OF VACCINES TO CONTROL BACTERIAL INFECTIONS IN MARINE FISH

Romalde J.L.

Departamento de Microbiología y Parasitología. Facultad de Biología. Universidad de Santiago. 15782, Santiago de Compostela. Spain

In the last two decades, the development of vaccines to prevent bacterial infections in marine fish has been one of the main areas of aquaculture research. In fact, such approach has been effectively used to control and prevent some of the most threatening bacterial diseases in mariculture like vibriosis and turbot streptococcosis. A consequence of the increase of the marine aquaculture operations and the inclusion of new fish species in the culture systems was the appearance of new pathologies or the re-emergence of known diseases of bacterial aetiology. In this work, a review of the recent advances in this research area will be made, with special emphasis on the Mediterranean marine aquaculture. The main bacterial fish diseases affecting today the different cultures in the area are photobacteriosis in seabream, seabass and sole, tenacibaculosis affecting mainly turbot and sole, pseudomonadiosis in seabream, seabass and turbot, and Edwarsiellosis in turbot.

A commercial vaccine already exists against photobacteriosis, which has been extensively used in Spain in the seabream cultures with good results. The great antigenic homogeneity found among *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* isolates regardless their geographic origin, greatly facilitated the development of such bacterin. With respect to tenacibaculosis, the characterization of the sole isolates of *Tenacibaculum maritimum* showed that they constitute a serological group different from those obtained from turbot and salmon, which indicate the need of developing a specific vaccine. This bacterin was elaborated and tested, showing a RPS higher than 90%. Polyvalent vaccines for sole including both bacteria (*Ph. damsela* subsp. *piscicida* and *T. maritimum*) were evaluated, observing some antigen competition effects. Regarding to fish pseudomonadiosis, a formalin-killed bacterin was prepared and tested in both turbot, at a laboratory scale, and seabream in a field study. The bacterin protected turbot for more than three months and, under field conditions, allowed to prevent the appearance of the disease during the 2002 winter season in a seabream farm located in the Mediterranean coast of Spain. Finally, a bacterin was prepared for the prevention of Edwarsiellosis in turbot showing promising results for its use in the field.

L'UTILIZZO DI VACCINI NEL CONTROLLO DELLA LATTOCOCCOSI IN TROTTICOLTURA

Manfrin A.¹, Prearo M.², Volpatti D.³, Fabris A.⁴

¹ Centro di Referenza Nazionale di Ittiopatologia, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro (PD); ² Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino; ³ Dipartimento di Scienze Animali, Sezione di Biologia e Patologia Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria, Udine; ⁴ Associazione Piscicoltori Italiani, Verona.

La Lattococcosi, causata da *Lactococcus garvieae*, risulta essere, da alcuni anni, la principale patologia batterica che colpisce l'allevamento della trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*) in Italia ed è in grado di causare mortalità anche del 30-50%, soprattutto nelle fasi finali di ingrasso, arrecando gravi perdite economiche all'allevatore.

A causa della scarsa efficacia e degli elevati costi della terapia antibiotica, negli ultimi anni sempre più allevatori sono ricorsi alla profilassi vaccinale, utilizzando sia vaccini sperimentali sia vaccini stabulogeni inoculati per via intraperitoneale.

Dopo la grave siccità dell'estate 2003, durante la quale si sono verificate perdite anche dell'80% dei lotti colpiti, l'Associazione Piscicoltori Italiani ha chiesto agli Istituti Zooprofilattici Sperimentali e ad alcune Facoltà di Medicina Veterinaria di unire le proprie forze e di potenziare al massimo la produzione di vaccini stabulogeni e sperimentali, per tentare di contenere tale patologia. Durante il triennio 2004-2006 sono state prodotte oltre 5 milioni di dosi di vaccino, in parte senza adjuvante ed in parte con l'aggiunta di adjuvanti oleosi di ultima generazione.

Tutti gli animali sono stati vaccinati per via intraperitoneale alla dose di 0,2 ml/capo, ottenendo una protezione variabile dai 3 ai 6 mesi, a seconda del tipo di vaccino utilizzato.

In nessun caso si sono verificate mortalità significative a seguito delle operazioni di anestesia e iniezione e la mortalità cumulativa totale dei gruppi vaccinati è risultata sempre inferiore al 10% anche in presenza di episodi di lattococcosi clinica.

Numerosi fattori possono aver condizionato i risultati della profilassi vaccinale, tra cui le modalità di intervento (manuale o automatico), il tipo di vaccino, il momento in cui è stato utilizzato, l'andamento della stagione estiva e la necessità di selezionare gli animali in base alle esigenze del mercato. Tuttavia la mortalità cumulativa e la percentuale di effetti secondari indesiderati (aderenze peritoneali e granulomi) tali da far scartare gli animali al momento della vendita, sono rimasti su valori percentuali estremamente bassi.

Nonostante le difficoltà e consapevoli di non potersi affidare solo alle favorevoli condizioni climatiche, gli allevatori stanno gradualmente inserendo la vaccinazione contro la lattococcosi nella gestione sanitaria routinaria dei propri impianti.

PROBLEMATICHE E NORMATIVE LEGATE ALLA MESSA A PUNTO DI UN VACCINO

Locatelli L.

Associazione Piscicoltori Italiani, Verona

Tutti i farmaci ad uso veterinario, anche quelli destinati all'utilizzo sulle specie ittiche di allevamento, devono essere stati autorizzati dalle autorità competenti prima della loro immissione sul mercato. Tale obbligo si applica sia ai farmaci a scopo terapeutico e/o clinico, quali antibiotici, anestetici, disinfettanti, sia ai farmaci ad attività immunologica, quindi i vaccini, sia spenti che attenuati. In ogni caso, è l'azienda farmaceutica proprietaria del medicinale responsabile per la presentazione della domanda di registrazione.

Oggi giorno le modalità di autorizzazione di un farmaco veterinario sono molteplici, grazie al tentativo da parte dell'Unione Europea di agevolare e rendere più omogenee le procedure di registrazione in tutti i Paesi Membri: accanto all'originale procedura di registrazione nazionale si sono aggiunte delle modalità di registrazione valide a livello europeo, quali

- la procedura centralizzata
- la procedura decentralizzata
- a procedura di mutuo riconoscimento.

Allo stesso tempo, sono stati organizzati gruppi di lavoro a livello centrale per la valutazione della registrazione di farmaci destinati a specie da reddito di minore interesse commerciale, le cosiddette specie minori, e/o per farmaci con un utilizzo collaterale (uso minore).

In tutti questi casi un ruolo predominante, seppure di diversa tipologia, viene giocato dall'Agenzia Europea del Farmaco, o EMEA, istituita dal Regolamento CEE n. 2309/93, modificato dal Regolamento CE n. 726/2004, che agisce in concertazione con la Commissione Europea, responsabile della finale autorizzazione all'immissione in commercio del farmaco. Al contrario, nelle procedure di registrazione di tipo nazionale, laddove la necessità di un farmaco sia legato ad esigenze locali e quindi non esportabili all'estero, l'autorizzazione viene rilasciata dalle autorità competenti dello Stato Membro, nel caso dell'Italia dall'AIFA, Agenzia Italiana del Farmaco, dipendente dal Ministero della Salute.

Procedure europee:

Procedura centralizzata (Reg. CE n. 726/2004): questa procedura fornisce un'autorizzazione all'immissione in commercio valida contemporaneamente in tutti i paesi dell'Unione Europea, tramite la richiesta e presentazione di dossier presso gli uffici dell'EMA. Tale tipo di registrazione è obbligatoria per taluni farmaci, ad esempio quelli derivati dalle biotecnologie ed i promotori della crescita per gli animali da reddito; è facoltativa invece per tutti gli altri tipi di prodotti. La valutazione del dossier viene effettuata da esperti scelti dal Comitato Permanente per i Medicinali Veterinari (CVMP) mentre la decisione finale, sulla base del Parere definitivo redatto dal CVMP, viene presa dalla Commissione Europea.

Procedura decentralizzata (Dir. 2001/82/CE come modificata dalla Dir. 2004/28/CE): è una procedura che prevede la simultanea registrazione di un medicinale veterinario presso più Stati Membri ed in cui l'EMA gioca un ruolo di coordinamento. L'autorizzazione finale viene sempre rilasciata dalla Commissione.

Procedura di Mutuo Riconoscimento (Dir. 2001/82/CE come modificata dalla Dir. 2004/28/CE): anche con questo tipo di procedura la registrazione ha validità in più di uno

Stato Membro, secondo la richiesta presentata all'inizio del procedimento. In questo caso però un solo Paese viene indicato come Stato Membro di Riferimento e saranno le sue autorità competenti a valutare per prime il dossier di registrazione presentato dall'azienda farmaceutica e responsabili della presentazione di un Parere alle autorità competenti degli altri Stati Membri in cui l'azienda farmaceutica ha richiesto di presentare la domanda di registrazione per lo stesso prodotto. Anche in questo caso, l'EMA svolge un ruolo di coordinamento, mentre è la Commissione stessa ad emettere la Decisione finale di autorizzazione all'immissione in commercio. E' ovvio che il dossier di registrazione presentato per il farmaco debba essere identico in tutte le sue parti in ogni Paese Membro in cui tale richiesta viene presentata.

Come precedentemente accennato, i vaccini per pesci di allevamento destinati all'alimentazione umana devono in generale seguire una di tali procedure per poter essere immessi sul mercato. E' da tutti risaputo però che il settore dell'acquacoltura, in Italia come negli altri paesi europei, così come altre produzioni zootecniche di tipo minore, non suscitino l'interesse della maggior parte delle aziende farmaceutiche, soprattutto a fronte dei forti costi necessari sia per lo studio di nuove molecole, sia per la preparazione del dossier di registrazione, che prevede studi di sicurezza e di efficacia, sia in laboratorio che in campo. Questo problema si accentua maggiormente quando i farmaci sono necessari per malattie emergenti o a diffusione limitata ad alcune aree geografiche. Per valutare lo stato dell'arte e cercare di agevolare la disponibilità di farmaci veterinari per le specie o gli utilizzi minori (i cosiddetti MUMS), da alcuni anni l'EMA, in collaborazione con gli ordini veterinari, rappresentanti delle autorità competenti ed esperti dei vari settori zootecnici, ha cercato di studiare delle possibilità per colmare le lacune farmacologiche esistenti. Una serie di documenti di lavoro sono stati pubblicati nel corso di questi ultimi anni, ma ad oggi nessun mezzo ufficiale è ancora disponibile per la risoluzione di questo annoso problema.

In ultimo, bisogna considerare che ad oggi la definizione stessa di "specie minore", valutata in base al numero di animali allevati in Europa, ha purtroppo escluso la vasta famiglia dei Salmonidi, che dunque ricadono a tutti gli effetti tra le specie "maggiori" ed i cui farmaci devono seguire gli iter di registrazione più classici e sopra descritti.

EPITELIOCISTI IN ORATA (*SPARUS AURATA*) D'ALLEVAMENTO: OSSERVAZIONI ISTOPATOLOGICHE

Quaglio F.¹, Florio D.², Caffara M.², Rogato F.³, Fioravanti M.L.²

¹ Dipartimento di Sanità Pubblica, Patologia Comparata ed Igiene Veterinaria, Università di Padova, Legnaro (PD); ² Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale, Università di Bologna, Ozzano Emilia (BO); ³ Skretting S.p.A., Mozzecane (VR)

L'Epiteliocisti, sostenuta da organismi intracellulari *Chlamydia*-like (OCL), rappresenta un'infezione benigna, talvolta a carattere proliferativo, del tessuto epiteliale cutaneo e, soprattutto, branchiale descritta in numerose specie ittiche marine e dulciacquicole. L'infezione è caratterizzata dalla formazione di cisti bianco-giallastre o traslucide che rappresentano cellule epiteliali ipertrofiche infette, in genere circondate da cellule squamose o cuboidali. A causa delle difficoltà insite nell'isolamento e nella coltivazione *in vitro* dell'agente eziologico, la diagnosi di Epiteliocisti si basa attualmente sulla evidenziazione delle caratteristiche cisti all'esame microscopico di preparati a fresco di branchie e cute, in genere con il supporto di osservazioni istologiche. La diagnosi eziologica viene comunque raggiunta solo mediante microscopia elettronica. Sebbene presenti in genere decorso asintomatico o paucisintomatico ed esito fausto, l'Epiteliocisti è stata talvolta associata ad episodi morbosi e a mortalità in alcune specie ittiche, fra cui l'orata (*Sparus aurata*).

Nel corso del 2006 sono state esaminate 21 orate di diversa provenienza: 10 (peso medio: 70g) prelevate per controlli sanitari da un sistema a ricircolo in corso di prove sperimentali (gruppo A), e 11 (peso medio: 3,5g) campionate nel corso di un episodio di mortalità presso un allevamento intensivo in gabbie galleggianti sottocosta (gruppo B). Tutti i soggetti sono stati sottoposti ad esame necroscopico, parassitologico, batteriologico ed istologico. L'esame istologico è stato condotto su porzioni di branchie, fissate in formalina tamponata al 10% ed incluse in paraffina. Sezioni di 5µm sono state colorate con Ematossilina Eosina, PAS, Giemsa, Ziehl-Neelsen e Tricromica di Crossmonn.

All'esame microscopico a fresco, in tutti i soggetti dei gruppi A e B si riscontravano cisti branchiali riferibili ad Epiteliocisti, mentre l'esame parassitologico dava esito negativo. L'esame batteriologico permetteva di isolare *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* da tutte le orate del gruppo B, mentre risultava negativo negli altri soggetti. L'esame istologico, effettuato sulle branchie di tutti i soggetti che avevano mostrato cisti riferibili ad Epiteliocisti, evidenziava due diverse tipologie di lesione: cisti granulose basofile e cisti con contenuto basofilo amorfo. Cellule ipertrofiche delle dimensioni variabili da 16,5×16,5 a 30×50µm con inclusioni granulose eterogenee si presentavano a carico dell'epitelio delle lamelle degli archi branchiali circondate da esile parete ialina, PAS-positiva. Tali lesioni si riscontravano perlopiù in posizione interlamellare più frequentemente alla base delle lamelle, talvolta con lieve iperplasia dell'epitelio, quando l'infezione era di lieve intensità. In infezioni massive le cisti potevano interessare la quasi totalità delle lamelle branchiali e presentarsi anche sovrapposte e l'iperplasia epiteliale era più grave. Talvolta si osservava congestione e reazione flogistica con abbondante presenza di cellule a granuli eosinofili e linfociti. Le cisti a contenuto basofilo amorfo, aventi dimensioni variabili fino a 46×67 µm, non erano delimitate da capsula ma circondate da reazione proliferativa dell'ospite caratterizzata da cellule epitelioidi disposte in strati concentrici. Le osservazioni istopatologiche condotte su orate d'allevamento affette da Epiteliocisti hanno evidenziato come nel tessuto branchiale infetto si possano instaurare reazioni infiammatorie di diversa entità a seconda dell'intensità d'infezione, indicando come questa patologia a decorso benigno possa comunque determinare ipofunzionalità respiratoria e presumibilmente predisporre il tessuto branchiale a patologie secondarie.

NUOVE SEGNALAZIONI DI INFEZIONI BATTERICHE IN STORIONI D'ALLEVAMENTO SUL TERRITORIO NAZIONALE

Brunetti R.¹, Gasparri F.², Arsieni P.¹, Marturano S.³, Prearo M.¹

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino; ² Skretting S.p.A., Mozzecane (VR); ³ Studio Acquanostra, Cusago (MI)

L'allevamento dello storione rappresenta una realtà importante nel panorama dell'acquacoltura nazionale, sia per la produzione di uova lavorate sottoforma di caviale sia per la produzione della carne; le specie maggiormente utilizzate a tale scopo sono lo storione bianco (*Acipenser transmontanus*), lo storione siberiano (*A. baeri*), lo storione russo (*A. gueldenstadti*) e soggetti ibridi (ad es. *A. naccari* x *A. baeri*). Inoltre esistono sul territorio nazionale alcune realtà che allevano specie poco consuete come lo sterleto (*A. ruthenus*). Lo storione è sempre stato considerato una specie ittica in cui poco frequentemente comparivano episodi di mortalità da ricondurre a cause batteriche. Negli ultimi anni sono state descritte sul nostro territorio alcuni episodi, contraddistinti da mortalità a volte anche pesanti, causate da *Aeromonas hydrophila* (in sterleti e storioni siberiani) e *Pseudomonas fluorescens* (in storioni siberiani). Nel presente lavoro vengono descritti due episodi sostenuti da *A. sobria* in storioni siberiani e da *Plesiomonas shigelloides* in storioni russi. *A. sobria* viene spesso associata a forme di tossinfezioni alimentari nell'uomo per consumo di prodotti ittici, ma ultimamente è stata spesso isolata in purezza in pesci ornamentali e d'allevamento, a volte anche in soggetti con sintomatologia conclamata. *P. shigelloides* viene indicato nell'uomo quale possibile causa di forme gastrointestinali e di forme extraintestinali, quali ascessi pancreatici, osteomieliti e poliartriti. E' stato inoltre associato più volte a forme enteriche in diverse specie ittiche. Nel corso del periodo estivo-autunnale 2005 sono stati esaminati numerosi campioni di storione di diverse pezzature provenienti da allevamenti dell'Italia settentrionale; i pesci manifestavano in vasca una sintomatologia aspecifica, con anoressia e letargia, in alcuni casi con mortalità consistente. Vengono qui riportati due episodi d'infezione batterica causati da agenti eziologici non ancora descritti sul territorio nazionale in questi ospiti. Il primo caso riguarda un gruppo di giovani riproduttori di storione russo (*A. gueldenstadti*) giunto in laboratorio nella tarda estate (settembre) ed il secondo un lotto di giovani storioni siberiani (*A. baeri*) di circa 15 cm di lunghezza, pervenuti alle analisi all'inizio del periodo autunnale (ottobre). In entrambi i casi all'esame anatomopatologico i soggetti presentavano una forma di enterite catarrale; nei soggetti del secondo gruppo erano presenti numerose emorragie sparse a livello dei visceri nei soggetti del secondo campionamento. L'esame colturale di primo isolamento, effettuato su Agar sangue e (per esteso) TSA, è risultato positivo per entrambi i campioni. Le colonie sviluppatasi dopo circa 24 ore di incubazione a $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ sono state sottoposte ad analisi colturali (trapianti su terreni selettivi), fenotipiche e biochimiche (API 20E, API 20NE, test biochimici in macrometodo), che hanno evidenziato in purezza *P. shigelloides* nel primo caso e *A. sobria* nel secondo. Va poi evidenziato come negli altri campionamenti condotti sugli stessi ospiti siano stati isolati, sempre in purezza, *A. hydrophila* in tre casi e *P. fluorescens* in altri 2 casi, confermando le segnalazioni precedentemente effettuate. Mentre nel primo caso l'isolamento di *P. shigelloides* da soggetti adulti di storione russo può essere senz'altro riferito al un forte stress subito dai pesci a seguito della manipolazione effettuata pochi giorni prima della comparsa dei sintomi, con perdurare della sintomatologia per lungo tempo, nel secondo caso i giovani storioni siberiani infetti da *A. sobria* erano stabulati in condizioni ottimali e non avevano apparentemente subito alcun tipo di stress ambientale. Vanno quindi approfonditi gli studi su questi patogeni di origine batterica per chiarire il loro effettivo ruolo primario o opportunista nel determinismo di patologie negli storioni.

IDENTIFICAZIONE FENOTIPICA E MEDIANTE TECNICHE DI BIOLOGIA MOLECOLARE DI CEPPI DI *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* ISOLATI DA PESCI MARINI

Fasolato L.¹, Corrain C.¹, Qualtieri K.², Rosteghin M.¹, Arcangeli G.¹, Bovo G.², Manfrin A.¹

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Laboratorio di Adria (RO); ²Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro (PD)

Nella presente indagine sono stati testati 11 ceppi, isolati da casi clinici in pesci marini di allevamento dal 1999 al 2005, precedentemente identificati fenotipicamente come *Vibrio parahaemolyticus*, al fine di confermarne la tipizzazione mediante l'utilizzo in parallelo di prove biochimiche e della PCR. I ceppi di *Vibrio*, conservati in cryobanks, sono stati rivitalizzati in Marine Broth, Blood Agar e Marine Agar. I terreni di coltura sono stati incubati a 22°C ± 2 per 24 ore, si è quindi proceduto alla caratterizzazione fenotipica valutando la crescita su terreno selettivo Thiosulphate Citrate Bile Sucrose, resistenza a O/129 150µg, O/129 10µg, Kligler Iron Agar 2,5% NaCl, e sistemi API 20E e API 20NE. Le metodiche PCR adottate sono quelle in uso presso l'Istituto Superiore di Sanità che prevedono l'identificazione del gene ToxR per la tossina TL (thermolabile haemolysin) marker specie specifico e gene TDH (thermostabile direct haemolysin) e TRH (TDH related haemolysin) per ceppi tossigeni; come controlli negativi sono stati impiegati *V. fluvialis* (ATCC 33809) e *V. alginolyticus* (ATCC 17749).

N°	Specie	TCBS	0129 150	0129 10		API 20E	ID	API 20NE	ID	PCR		
										ToxR	TDH	TRH
ATCC 43996	<i>V. parahaemol.</i> TDH					4144106	99,9%			+	+	-
ATCC 17802	<i>V. parahaemol.</i> TRH					4154106	99,9%			+	-	+
2113/D	Branzino	V	S	S	^{24h} 48h	4144005 4144005	73,1% 73,1%	7030004 7430644	* *	-	-	-
182/itt	Orata	V	R	R	^{24h} 48h	4050004 4050104	Inacc. Inacc.	3400004 3400004	Inacc. Inacc.	-	-	-
234/I02	Orata	V	S	R	^{24h} 48h	4346104 4346107	92,5% 99,9%	3077744 3077764	97,8% 98,4%	+	-	-
257/I03	Sogliola	V	S	S	^{24h} 48h	4146105 4146105	73,0% 73,0%	7010004 7414044	** **	+	-	-
332/I03	Branzino	V	S	S	^{24h} 48h	4144105 4146105	97,0% 73,0%	7430004 7430044	* *	-	-	-
347/I03	Branzino	V	S	S	^{24h} 48h	4144105 4144105	97,0% 97,0%	7420004 7430044	* *	-	-	-
445/I03	Branzino	V	R	R	^{24h} 48h	4144105 4144105	97,0% 97,0%	7410626 7676764	Inacc. Inacc.	-	-	-
259/I04	Branzino	V	S	S	^{24h} 48h	4000004 4000004	Inacc. Inacc.	1666344 1666344	Inacc. Inacc.	-	-	-
324/I04	Branzino	V	S	S	^{24h} 48h	4144104 4144104	98,4% 98,4%	7456744 7476765	** Inacc.	+	-	-
506/V	Branzino	V	R	R	^{24h} 48h	4144005 4144005	73,1% 73,1%	7410004 7430044	Inacc. *	-	-	-
653/V	Branzino	V	S	S	^{24h} 48h	1040104 1040104	Inacc. Inacc.	7410004 7430004	Inacc. *	-	-	-

V= colonie verdi; S= sensibile; R= resistente; * ID *V. vulnificus*; ** ID *V. alginolyticus*.

Tutti i ceppi analizzati sono risultati fermentanti, glucosio +, lattosio -, saccarosio -, non produttori di H₂S e di gas. Il micrometodo API 20E ha riconosciuto, con percentuali di identificazione superiori al 90 %, come *V. parahaemolyticus* 5 ceppi su 11 (in grassetto). L'utilizzo delle gallerie API 20NE ha evidenziato 1 solo ceppo, identificando gli altri come *V. vulnificus* (n° 5) e *V. alginolyticus* (n° 2). Solo tre ceppi sono stati confermati con la PCR e nessuno di essi è risultato positivo per le due tossine termoresistenti.

DETERMINAZIONE PRECOCE DI *PHOTOBACTERIUM DAMSELAE* SUBSP. *PISCICIDA* E *LISTONELLA (VIBRIO) ANGUILLARUM* NELLE ACQUE: ESPERIMENTI IN MICROCOSMO

Zaccone R., Mancuso M., Caruso G., Ciuchini F.*, Adone R.*, Genovese L., Manfrin A.**

*Istituto per l'Ambiente Marino Costiero (IAMC) – CNR, Messina; * Istituto Superiore di Sanità, Laboratorio di Medicina Veterinaria, Roma; ** Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro (PD)*

L'insorgere di epidemie in allevamento intensivo è legato spesso alla qualità delle acque, alla presenza di portatori, alle condizioni ambientali ed alla presenza di fattori stressanti. Le malattie batteriche più diffuse nell'ambito della maricoltura sono la Photobatteriosi e la Vibriosi, trasmesse rispettivamente da *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* e *Listonella (Vibrio) anguillarum*. Lo scopo del nostro lavoro è quello di testare alcuni metodi di quantificazione batterica nelle acque per individuare precocemente lo sviluppo di eventuali malattie. A tal proposito sono stati effettuati due esperimenti in parallelo in cui venivano indotte entrambe le malattie. Per ciascun esperimento sono state allestite 4 vasche (300 l) ed 1 controllo, ciascuna contenenti 25 esemplari di *Dicentrarchus labrax* inoculati per via intraperitoneale con 100 µl di sospensione batterica ($3,1 \times 10^8$ cell/ml per *P. damsela* subsp. *piscicida* e $3,7 \times 10^4$ cell/ml per *L. anguillarum*). A tempi predeterminati sono stati prelevati i campioni di acqua da ciascuna vasca (controllo e infetti); i campioni sono stati utilizzati per testare tre differenti protocolli metodologici: uno specifico (Immunofluorescenza indiretta, IF) mediante l'utilizzo di sieri policlonali appositamente prodotti e due aspecifici (Live/Dead, L/D e DAPI) che permettono rispettivamente di poter discernere la frazione batterica vitale da quella non vitale e di effettuare una stima della densità batterica totale. Il challenge con *P. damsela* subsp. *piscicida* ha messo in evidenza già dal primo giorno, un aumento della concentrazione nelle vasche degli infetti ($1,71 \times 10^6$ cell/100ml, determinati in IF) con un andamento decrescente fino alla fine dell'esperimento (in cui non è stato più possibile riscontrare i batteri nell'acqua), mentre nella vasca di controllo *P. damsela* subsp. *piscicida* è risultato assente. Il conteggio dei batteri vitali nelle vasche degli infetti ha messo in evidenza un aumento di questi ultimi durante l'infezione, mentre la frazione non vitale si è mantenuta costante con una concentrazione di 10^5 cell/ml; nella vasca di controllo invece l'andamento dei batteri sia vivi che morti è andato diminuendo con il passare del tempo. Il conteggio totale mediante DAPI ha presentato lo stesso andamento dei L/D registrando negli infetti una concentrazione di un ordine di grandezza maggiore rispetto al controllo. L'infezione sperimentale con *L. anguillarum* ha mostrato nella vasca degli infetti valori di abbondanza batterica più elevati di un ordine di grandezza rispetto ai controlli già 24 ore dopo l'inoculo (rispettivamente $2,19 \times 10^4$ cell/100 ml e $1,6 \times 10^3$ cell/100 ml). Il conteggio dei batteri vitali nelle vasche degli infetti ha evidenziato un leggero aumento di questi ultimi durante l'infezione; la frazione non vitale è risultata presente in una concentrazione di un ordine di grandezza maggiore rispetto ai vitali. Il conteggio totale ha rispecchiato lo stesso andamento del metodo L/D con prevalenza batterica nelle vasche infette rispetto al controllo. Lo studio ha mostrato interessanti prospettive della tecnica di Immunofluorescenza indiretta: nel caso dell'infezione con *P. damsela* subsp. *piscicida* permette una precoce determinazione dei batteri patogeni, in quanto i batteri sono stati riscontrati solo nelle vasche degli infetti; nel corso dell'infezione con *L. anguillarum*, in cui i batteri sono normalmente presenti nell'ambiente (controllo), è necessario stabilire un valore soglia al di sopra del quale la densità batterica può costituire un campanello di allarme. La stima della popolazione batterica vitale e totale, rappresenta un indicatore meno specifico, poiché permette di valutare l'abbondanza della flora batterica naturale e fornisce informazioni sulla reale percentuale di batteri vitali nelle acque.

MORIA DI MUGILIDI NEL GOLFO DI GAETA (LAZIO)

Bossù T., Di Nocera F., Lanni L., Cortese M.*, Monfrinotti M.*, Aguzzi L.*

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana, D.O. Sviluppo e Sicurezza delle Produzioni Ittiche, Roma; *Arpa Lazio, Sezione Provinciale di Latina*

Nei mesi di giugno-luglio 2006 il tratto di mare compreso tra il Golfo di Gaeta e la Foce del Fiume Garigliano è stato interessato da un fenomeno di moria di pesci appartenenti principalmente alla famiglia dei Mugilidi.

Nello stesso periodo sono stati condotti sopralluoghi ed indagini su campioni di acqua e pesci, con misure dei principali parametri microbiologici e chimico-fisici nel tratto di mare interessato e lungo il fiume Garigliano.

Le indagini, condotte sia dall'Arpa Lazio - Sezione Provinciale di Latina sia dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana non hanno evidenziato particolari situazioni di criticità dei parametri chimici e microbiologici delle acque, mentre le analisi microbiologiche condotte sia sui pesci selvatici (*Mugil cephalus*) che allevati (*Dicentrarchus labrax*), quest'ultimi provenienti da gabbie a mare ove si era verificato un episodio di mortalità all'inizio del mese di giugno ed insistenti nella zona del golfo di Gaeta, hanno evidenziato la presenza di *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, agente responsabile della "photobatteriosi", comunemente definita come "pasteurellosi dei pesci" o "pseudotubercolosi". Il patogeno è stato isolato da adulti di *Mugil cephalus* del peso medio di circa 1 kg, che presentavano le tipiche lesioni nodulari localizzate nella milza, indice di una forma cronica e da giovanili di *Dicentrarchus labrax* del peso medio di 75 g circa. I nostri risultati confermano che questa malattia può essere trasmessa facilmente dal selvatico all'allevato e viceversa, in conseguenza di particolari situazioni ambientali e climatiche. Come già riportato da altri autori, tra le specie selvatiche i Mugilidi risultano essere i più colpiti.

Le indagini virologiche condotte hanno evidenziato la presenza di nodavirus nelle spigole allevate ed in un unico campione di cefalo che è nel contempo risultato negativo alla ricerca di *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*.

Tra i parametri fisici analizzati, la temperatura superficiale delle acque mostra valori più elevati in corrispondenza della moria di pesci, con presenza di termoclino alla profondità di 4 metri; tale fenomeno non è più osservabile ad agosto, in cui si osserva deciso rimescolamento delle acque lungo tutta la colonna.

STUDIO SUL MIGLIORAMENTO DELLA BIOASSIMILABILITA' ORALE DI UN VACCINO ANTI-*PHOTABACTERIUM DAMSELAE* SUBSP. *PISCICIDA* NELLA SPIGOLA (*DICENTRARCHUS LABRAX*)

Manuali E.¹, Tiberi C.¹, Di Salvo A.², Agnetti F.¹, della Rocca G.², Ghittino C.¹, Malvisi J.²

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Perugia; ² Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Perugia

La Photobatteriosi (ex Pasteurellosi) dei pesci, sostenuta dal germe Gram negativo *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida* (*Phdp*), è causa di elevata mortalità in molte specie ittiche marine. Recentemente, numerosi tentativi sono stati fatti per controllare la patologia mediante la formulazione, e quindi la valutazione dell'efficacia, di vaccini sperimentali attraverso varie vie di somministrazione. A fronte di un'efficacia ben consolidata con l'impiego di tecniche vaccinali per somministrazioni endoperitoneali e per immersione, i risultati ottenuti per somministrazione orale non hanno dato, a tutt'oggi, esiti incoraggianti. A differenza di quanto si realizza con le tecniche finora in uso, è ampiamente riconosciuto come la somministrazione orale sia ottimale in ragione di una mancata induzione stressogena negli animali, una forte incidenza sul miglioramento del benessere animale, una piena riuscita dell'efficacia clinica e quindi sullo stato di salute dei pesci in allevamento. A tal fine, si stanno sperimentando tecniche di microincapsulazione aventi la funzione di rilasciare l'antigene nel tratto intestinale posteriore, zona di massimo assorbimento nelle specie ittiche, evitando possibili fenomeni di inattivazione chimica (pH) o enzimatica (proteasi) nel tratto gastro-enterico. Uno dei metodi atti a svelare la capacità di assorbimento tissutale del vaccino si avvale di indagini immunostochimiche che permettono di dimostrare l'effettiva presenza dell'antigene nel soggetto vaccinato. *Phdp* ha infatti la capacità di aderire a mucosa intestinale e muco cutaneo, e l'apparato digerente è considerato l'organo attraverso il quale si attua l'infezione naturale.

Scopo del presente lavoro è stato quello di determinare nella spigola (*Dicentrarchus labrax*) la bioassimilabilità orale di due tipologie di vaccino microincapsulato anti-*Phdp*, attraverso metodiche immunostochimiche ed immunocitochimiche atte a valutare l'eventuale presenza tissutale dell'antigene e la sua distribuzione cellulare. Le indagini di microscopia ottica ed elettronica hanno evidenziato la presenza dell'antigene vaccinale all'interno degli enterociti, dimostrandone la capacità di assorbimento attraverso fenomeni di adesione ed invasione delle cellule epiteliali intestinali, stazionando all'interno di formazioni vacuolari di probabile origine fagosomiale.

VAGOCOCCUS SALMONINARUM: DESCRIZIONE DI UN FOCOLAIO DI MALATTIA IN RIPRODUTTORI DI TROTA IRIDEA (*ONCORHYNCHUS MYKISS*).

Salogni C.¹, Pitozzi A.¹, Perantoni P.², Alborali G.L.¹

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, Brescia;
² Veronesi Verona S.p.A., Verona

Le informazioni inerenti la streptococcosi nel nostro Paese riguardano prevalentemente *Lactococcus garvieae* e *Vagococcus salmoninarum* nella trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*). L'agente eziologico maggiormente diffuso è *L. garvieae*. L'infezione da *V. salmoninarum* è presente soprattutto nelle trotecolture di montagna.

Nell'episodio riportato viene descritto un focolaio di Vagococcosi setticemica in riproduttori di trota iridea verificatosi nei mesi di Giugno e Luglio del 2005, in una piscicoltura montana del Nord Italia. Nell'allevamento in questione erano presenti anche trote fario (*Salmo trutta*) e salmerini (*Salvelinus fontinalis* e *S. alpinus*) che non presentavano segni di malattia.

La sintomatologia era caratterizzata da apatia, inappetenza, esoftalmo bilaterale e melanosi cutanea.

Tutti i pesci pervenuti in laboratorio sono stati sottoposti ad esame anatomopatologico, esami routinari parassitologici microscopici a fresco da cute e branchie, colturali da visceri su Agar sangue e TSA (incubati a 22°C per 48h) ed a esame virologico su monostrato cellulare (BF-2 e RTG-2). L'esame autoptico ha evidenziato un versamento sieromorragico celomatico, congestione ed aumento di volume di fegato e milza e infiammazione ed ispessimento della sierosa peritoneale e vescica natatoria.

L'esame colturale ha permesso l'isolamento di *V. salmoninarum* in purezza da cervello, occhio, rene, fegato e milza in tutti i soggetti analizzati. La tipizzazione del microrganismo è stata possibile tramite caratterizzazione biochimica in macrometodo e sequenziamento genomico dell'RNAr 16S.

Gli esami parassitologici e virologici hanno avuto esito negativo.

Il riscontro di una forma clinica setticemica piuttosto che della localizzazione encefalica ed oculare può essere correlato allo stress indotto dalla spremitura precedentemente eseguita in allevamento.

UTILIZZO DELLA REAL-TIME PCR NELL'IDENTIFICAZIONE DI 80 CEPPI DI LACTOCOCCUS GARVIEAE ISOLATI DA TROTA IRIDEA (*ONCORHYNCHUS MYKISS*)

Manfrin A.¹, Fasolato L.¹, Corrain C.¹, Paparella A.⁴, Quattieri K.², Rosteghin M.¹, Arcangeli G.¹, Prearo M.³, Bovo G.²

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Laboratorio di Adria (RO); ² Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro (PD); ³ Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino; ⁴ Libero Professionista, Mestre (VE)

Lactococcus garvieae, isolato per la prima volta da trotiltture italiane agli inizi degli anni '90, continua ad essere il principale patogeno batterico causa di malattia nella trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*). Fenotipicamente *L. garvieae* si avvicina molto a *L. lactis lactis* e questo spesso può essere causa di una scorretta interpretazione diagnostica. Ad evitare ciò si usa confermarne la resistenza alla clindamicina e la fermentazione della salicina, oltre ad effettuare una sieroagglutinazione rapida (SAR) su vetrino con sieri policlonali specifici. Per un'analisi più precisa si ricorre al controllo tramite PCR specie-specifica che permette di distinguerlo dalle altre specie di streptococchi che sono coinvolte nella sindrome "pop-eye" e che parecchia confusione hanno creato in passato nel determinarne la giusta posizione tassonomica. Durante la nostra indagine abbiamo effettuato la tipizzazione biochimica e sierologica di 80 ceppi isolati da allevamenti del Veneto a partire dal 1993 ad oggi, affiancando successivamente la tipizzazione mediante PCR classica e Real-Time PCR mirate ad individuare una sequenza corrispondente al 16 S ribosomiale del DNA batterico.

Solo un ceppo è risultato non essere *L. garvieae*, probabilmente per un'errata interpretazione delle prove biochimiche, mentre alcuni ceppi tipizzati come *L. lactis lactis* sono in realtà stati identificati mediante le tecniche di biologia molecolare come *L. garvieae*.

L'utilizzo della Real-Time PCR si è dimostrato uno strumento molto valido per la corretta tipizzazione dei lattococchi in quanto è una tecnica estremamente rapida, molto sensibile, in grado di dare informazioni aggiuntive sulla filogenesi dei ceppi in esame e sulla quantità di materiale genetico contenuta nel campione in esame (analisi semi-quantitativa). Tale metodica permette inoltre di identificare il patogeno a partire da matrici biologiche, come il sangue, di individuare eventuali portatori sani e di effettuare una diagnosi precoce della malattia.

VALUTAZIONE DELLA PROTEZIONE INDOTTA DA FRAZIONI ANTIGENICHE DI *LACTOCOCCUS GARVIEAE* IN TROTA IRIDEA (*ONCORHYNCHUS MYKISS*)

Volpatti D., Contessi B., Buonasera E., Gusmani L., Bertoia M., Galeotti M.

Dipartimento di Scienze Animali, Sezione di Biologia e Patologia Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Udine, Udine

La Lattococcosi ittica, causata da *Lactococcus garvieae*, negli ultimi anni è diventata la principale malattia batterica che colpisce gli allevamenti di trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*) del nord Italia. Nel corso della stagione estiva, infatti, si osserva un continuo aumento del numero di focolai e le perdite da essa causate possono raggiungere percentuali anche molto elevate (50-60%), con ingenti danni per gli allevatori.

La profilassi vaccinale contro questa malattia è ancora in fase sperimentale e contempla l'utilizzo di vaccini stabulogeni costituiti da cellule intere inattivate con formalina somministrate per via intraperitoneale, anche se la protezione che ne deriva va da un minimo di 3 mesi ad un massimo di 8 mesi, per i vaccini adiuvati. I componenti antigenici coinvolti nella protezione dall'infezione non sono noti. Inoltre, rispetto al gran numero di sostanze immunogene presenti sulla parete batterica, tali antigeni sono probabilmente poco rappresentati e questo fatto potrebbe influire sulla durata della protezione garantita dalle formulazioni vaccinali proposte.

La ricerca si pone come obiettivo quello di approfondire le conoscenze sulla Lattococcosi ittica, causata da *L. garvieae*, e in particolare modo sulle componenti antigeniche del patogeno in grado di suscitare una risposta immunitaria protettiva nei confronti della malattia. Il ceppo batterico impiegato in questa ricerca è stato isolato nel corso di un episodio spontaneo di Lattococcosi in un allevamento ittico della regione Friuli Venezia Giulia nel 2005. Dal suddetto ceppo batterico sono stati ottenuti i seguenti antigeni:

- prodotti batterici extracellulari (ECP);
- cellule batteriche intere inattivate (WC);
- antigeni di membrana (AM).

I campioni sono stati sottoposti a dosaggio proteico e ad elettroforesi su gel di acrilamide-*bis* acrilamide al 10% per evidenziare, dopo opportune colorazioni, il peso molecolare del materiale estratto.

Per valutare l'azione protettiva dei diversi antigeni è stata condotta una prova di immunizzazione su soggetti di trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*) di peso medio pari a 90 grammi, provenienti da un allevamento ritenuto indenne dalla malattia. Tre gruppi di 42 soggetti sono stati immunizzati per via intraperitoneale con i diversi antigeni, previa anestesia. Un quarto gruppo di 42 soggetti è stato utilizzato come controllo. Tutti i soggetti immunizzati sono stati sottoposti a un richiamo dopo 18 giorni seguendo la medesima procedura. Per valutare la protezione, 30 soggetti per gruppo sono stati sottoposti ad infezione sperimentale con *L. garvieae*, 8 giorni dopo il richiamo, inoculando intraperitoneo $2,6 \times 10^5$ UFC/soggetto. La mortalità è stata valutata nell'arco dei 10 giorni successivi e la protezione espressa come percentuale relativa di sopravvivenza (RPS).

I trattamenti hanno garantito le seguenti percentuali relative di sopravvivenza (RPS): 95% per WC, 35% per ECP, 33% per AM. Questi risultati confermano che le cellule intere inattivate con formalina conferiscono la maggiore protezione tra gli antigeni impiegati. Tuttavia anche le frazioni ECP ed AM risultano efficaci in tal senso, seppure con RPS più basse.

Dai gruppi immunizzati, inoltre, sono stati prelevati campioni di siero, ed è stato eseguito un Western Blotting, dopo corsa elettroforetica dei diversi antigeni, per evidenziare le bande proteiche riconosciute dagli anticorpi contenuti nel siero.

L'IMPIEGO DI ERITROMICINA IN ACQUACOLTURA: TEMPI DI DEPLEZIONE E DI SOSPENSIONE PER LE TROTE

Guandalini E., Esposito A., Lucchetti D., Fabrizi L., Coni E.

Centro Nazionale per la Qualità degli Alimenti ed i Rischi Alimentari, Istituto Superiore di Sanità, Roma

E' opinione comune che il ricorso a farmaci veterinari o a sostanze disinfettanti debba essere limitato quanto più possibile per evitare fenomeni di inquinamento ambientale, per la presenza di residui nei tessuti e per l'instaurarsi di meccanismi di farmaco resistenza. Purtroppo, il numero e la diffusione di agenti eziologici (vecchi e nuovi) e la loro patogenicità, spesso impongono il ricorso ai trattamenti chemioterapeutici. L'impiego del farmaco veterinario in Italia è regolamentato essenzialmente dal D.Lvo 119/90 (e successive modifiche) e dal Reg. (CE) 2377/90. Attualmente solo pochi farmaci sono stati registrati per l'acquacoltura, e non risultano sufficienti a contrastare tutte le patologie. Quindi a volte è necessario ricorrere ad altre sostanze, non registrate specificatamente per pesci, attraverso "l'autorizzazione in deroga" da parte del medico veterinario. L'eritromicina è una di queste sostanze. E' un antibiotico che risulta particolarmente efficace contro la Bacterial Kidney Disease (BKD), e più recentemente ha mostrato una apprezzabile azione contro la lattococcosi e streptococcosi (*Lactococcus garvieae*, *L. lactis lactis*, *Streptococcus iniae*, *Vagococcus salmoninarum*), due patologie che in questi anni hanno fortemente colpito gli allevamenti di trote in Italia.

Il Reg. (CE) n. 2377/90 prevede per l'eritromicina un limite massimo di residuo (LMR) di 200 µg/kg (muscolo + pelle), ma data l'assenza di registrazione del farmaco non vi è indicazione dei relativi tempi di sospensione. L'EMEA, in tali circostanze, prevede per i pesci un tempo di sospensione cautelativo di 500°C giorno.

Scopo della ricerca - L'obiettivo di questo studio era, quindi, quello di stimare i tempi di deplezione dell'eritromicina negli organi e tessuti di trote (*Oncorhynchus mykiss*) dopo una somministrazione di 100 mg kg⁻¹ p.c. die per un periodo di 21 giorni attraverso mangime medicato. Inoltre, sulla base dei dati raccolti e del LMR, si è proceduto al calcolo del relativo tempo di sospensione.

Materiali e metodi - Per la prova sperimentale sono state utilizzate 140 trote del peso di circa 200 g ciascuna, mantenute in vasca ad una temperatura di 11,5°C, pH 7,5 e O₂ a 9,5 mg l⁻¹. Dopo la fine del periodo di somministrazione sono stati prelevati gruppi di 10 trote ad intervalli di 3, 12, 24, 48, 96, 168, 240 e 720 ore. Un gruppo di trote, mantenuto separatamente nelle medesime condizioni di stabulazione ed alimentato con mangime non medicato, costituiva il controllo.

Il metodo impiegato per la determinazione dell'eritromicina mediante LC-MS/MS era validato sulla base dei requisiti riportati nella Decisione EC 2002/657.

Risultati - Lo studio ha evidenziato come i residui di eritromicina nel muscolo + pelle di trota scendessero sotto LMR dopo circa 150°C giorno che corrispondono a circa 13 giorni dopo la fine del trattamento nelle condizioni sperimentali sopra riportate.

Il calcolo del tempo di sospensione, effettuato applicando le procedure statistiche raccomandate dall'EMEA, è risultato pari a 255°C giorno corrispondenti a circa 22 giorni.

Conclusioni - Nonostante l'esposizione al trattamento farmacologico non sia stata di breve durata (21 giorni), i dati hanno evidenziato che l'eritromicina somministrata oralmente attraverso il mangime ha tempi di deplezione piuttosto brevi limitatamente al tessuto analizzato in questo studio. Alla luce di questi risultati, il tempo di sospensione cautelativo fissato dall'EMEA in 500°C giorno è sicuramente incongruente almeno nelle condizioni terapeutiche adottate nello studio.

INFEZIONE DA *MYCOBACTERIUM MARINUM*: DESCRIZIONE DI UN FOCOLAIO DI MALATTIA IN TROTA IRIDEA (*ONCORHYNCHUS MYKISS*) E FARIO (*SALMO TRUTTA*) D'ALLEVAMENTO

Salogni C., Zanoni M., Gelmetti D., Tagliabue S., Pacciarini M.L., Alborali G.L.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, Brescia.

La Micobatteriosi ittica è stata rilevata in un ampio numero di specie acquatiche in tutto il mondo sia in pesci d'allevamento che selvatici, d'acqua dolce o salata. Nell'episodio riportato viene descritto un focolaio di micobatteriosi ittica da *Mycobacterium marinum* in riproduttori di trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*) e fario (*Salmo trutta*) allevati intensivamente in un impianto di acquacoltura di fondo valle del Nord Italia. La patologia era in generale paucisintomatica. I rari casi conclamati erano caratterizzati da dimagrimento, desquamazioni e ulcere cutanee.

Gli esemplari pervenuti al laboratorio sono stati sottoposti ad esame anatomopatologico che ha evidenziato la presenza di lesioni nodulari grigiastre, di dimensioni variabili da pochi millimetri ad un centimetro, localizzate prevalentemente in sede epatica, splenica, renale e branchiale.

La diagnosi differenziale si è posta tra le patologie in grado di determinare lesioni granulomatose e/o nodulari come la Nefrite Batterica, micosi sistemiche, Malattia Proliferativa Renale ed alle patologie di origine non infettiva quali nefrocalinosi e neoplasie.

I campioni sono stati poi sottoposti ad esami routinari parassitologici microscopici a fresco e dopo colorazione, colturali da visceri su Agar sangue e TSA (incubati a 22°C per 48h) e KDM2 (incubato a 15°C per 21 giorni), micologici microscopici e colturali (Sabouraud solido e brodo incubati a 22°C per 5 giorni) e virologici su monostrato cellulare (BF-2 ed RTG-2). Sugli organi con lesioni si è eseguito l'esame istologico.

La ricerca dei micobatteri, da pool di organi (fegato, rene e milza), ha previsto le seguenti fasi: omogeneizzazione, decontaminazione (idrossido di sodio al 4%), esame colturale su terreni specifici solidi a base di rosso d'uovo (Löwestein-Jensen e Stonebrink) preparati a becco di clarino ed incubati in aerobiosi a 22 e 37°C per 42 giorni, ed infine identificazione (Biochimica, PCR e sequenziamento RNAr 16s).

Di tutti gli esami eseguiti solo quello colturale per i micobatteri ha dato esito positivo con isolamento e tipizzazione di *Mycobacterium marinum*. L'esame istologico ha consentito di individuare il carattere granulomatoso delle lesioni riscontrate nonché la presenza di batteri alcol-acido resistenti.

La distruzione di tutti i pesci allevati, unitamente a un vuoto sanitario protratto e ad un'accurata operazione di disinfezione ha evitato la ricomparsa della malattia.

VALUTAZIONE DELLE LESIONI ISTOPATOLOGICHE INDOTTE DA *MYCOBACTERIUM GORDONAE* IN *TRICHOGASTER TRICHOPTERUS*

Pezzolato M., Varello K., Prearo M., Mascarino D., Pavoletti E., Bozzetta E.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino

Le micobatteriosi atipiche sono un complesso di patologie sistemiche ad andamento cronico sostenute da batteri appartenenti al genere *Mycobacterium* riscontrate principalmente nelle specie ittiche ornamentali, ma presenti anche in quelle di allevamento.

Molti batteri del genere *Mycobacterium* sono stati identificati quali agenti causali di micobatteriosi atipiche nei pesci tra cui le specie più frequentemente isolate sono *M. marinum*, *M. chelone*, *M. fortuitum*, ma molte altre sono state isolate, tra cui *M. gordonae*, oggetto di tale studio.

Lo scopo del presente lavoro è quello di valutare le lesioni istopatologiche indotte da *M. gordonae* in un esemplare di *Trichogaster trichopterus* inoculato intraperitonealmente e la comparazione di diverse colorazioni utilizzate per l'identificazione di batteri alcool-acido resistenti.

In seguito all'esame anatomopatologico del pesce naturalmente deceduto dopo oltre due anni dall'inoculazione, sono state riscontrate lesioni granulomatose multiple disseminate negli organi interni (cuore, fegato, branchie) indicativi della diffusione sistemica del batterio. Al fine di una più precisa valutazione delle lesioni, gli stessi organi sono stati fissati in formalina tamponata al 10% e sottoposti ad esame istologico mediante colorazione Ematossilina-Eosina (EE). Successivamente, gli stessi organi sono stati sottoposti a colorazioni istochimiche Ziehl-Neelsen (ZN) e Auramina-Rodamina per identificare la presenza di batteri alcool-acido resistenti all'interno delle lesioni; inoltre è stata utilizzata la colorazione immunoistochimica con anticorpo policlonale anti-*Mycobacterium bovis* (IHC), come già utilizzata da altri autori. All'esame istologico con EE sono stati riscontrati granulomi multipli diffusi necrotizzanti caratterizzati da un'area centrale di materiale amorfo eosinofilo circondato da cellule infiammatorie e da una sottile capsula connettivale, indicative di uno stadio avanzato dell'infezione.

Le colorazioni istochimiche ZN e Auramina-Rodamina effettuate a livello delle lesioni hanno evidenziato la presenza di bacilli alcool-acido resistenti in numero variabile a seconda dell'organo analizzato (più elevato in fegato e cuore, rispetto alle branchie); lo stesso risultato è stato ottenuto con la colorazione IHC che ha evidenziato positività di diversa intensità.

L'utilizzo delle metodiche sopraccitate ha evidenziato la presenza dei micobatteri all'interno delle lesioni, permettendo di affermare che *M. gordonae* si comporta analogamente agli altri micobatteri che più comunemente sono associati a micobatteriosi ittiche. Inoltre si è evidenziato un numero maggiore di germi all'interno dei granulomi a livello epatico, rispetto a quelli presenti nel tessuto cardiaco o a livello branchiale.

Il caso qui descritto, pur non avendo validità statistica in quanto effettuato su un unico soggetto, evidenzia come le diverse colorazioni, istochimiche ed immunoistochimiche abbiano valore diagnostico ottenendo quadri analoghi; e di annoverare *M. gordonae* tra i possibili agenti causali di micobatteriosi atipica nei pesci, con presenza di un quadro anatomoistopatologico sovrapponibile a quanto descritto per altri micobatteri.

MICOBATTERIOSI NELLE SPECIE ITTICHE ORNAMENTALI: RISULTATI DI CINQUE ANNI DI MONITORAGGIO

Salogni C., Zanoni M., Pacciarini M.L., Tagliabue S., Alborali G.L.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, Brescia

Scopo del presente lavoro è stata la valutazione della prevalenza d'infezione da micobatteri e loro caratterizzazione nei campioni di pesci ornamentali pervenuti durante il periodo 2001-2005 al Laboratorio di Ittiopatologia della Sezione Diagnostica dell'IZSLER di Brescia. Tutti i pesci esaminati provenivano da partite di animali in libero commercio e da vasche di acquariofili. I campioni sono stati sottoposti ad esame anatomopatologico, esami routinari parassitologici, colturali ed in alcuni casi virologici su monostrato cellulare. Sono stati inoltre prelevati organi o visceri in toto ed utilizzati per l'isolamento dei micobatteri. Qualora siano state evidenziate, durante l'esame anatomopatologico, lesioni specifiche sospette si è effettuata anche esame istologico e colorazione di Ziehl-Neelsen.

L'isolamento dei micobatteri ha previsto le seguenti fasi: omogeneizzazione, decontaminazione (idrossido di sodio al 4%), esame colturale su terreni specifici solidi a base di rosso d'uovo (Löwestein-Jensen e Stonebrink) preparati a becco di clarino ed incubati in aerobiosi a 22 e 37°C per 42 giorni ed infine identificazione (biochimica, PCR e sequenziamento RNAr 16s).

Gli esami eseguiti hanno permesso di rilevare un'elevata percentuale di campioni positivi all'esame colturale (41% dei campioni). La presenza di lesioni macroscopicamente evidenti è stata tuttavia una evenienza rara. La caratterizzazione degli isolati batterici ha permesso l'identificazione di numerose specie tra cui spiccano *M. marinum*, *M. fortuitum*, *M. nonchromogenicum*, *M. peregrinum*, *M. farcinogenes*, *M. chelonae* e *M. gordonae*.

Non è mai stata tuttavia dimostrata la presenza di micobatteri tubercolari.

L'elevata prevalenza dell'infezione nei pesci ornamentali e la diversità delle specie di micobatteri isolate, con differente ruolo patogeno e zoonosico, suggerisce la necessità di un accurato esame microbiologico atto ad individuare le partite di pesci infetti e l'identificazione della specie di micobatterio coinvolto.

INDICE

AUTORI

Abete M.C.	28	Coni E.	52
Adone R.	46	Contessi B.	51
Agnetti F.	24, 48	Corrain G.	45, 50
Aguzzi L.	47	Cortese M.	47
Alborali G.L.	25, 49, 53, 55	Culurgioni J.	16, 23
Angelucci G.	25	Cusimano M.	22
Arcangeli G.	45, 50	Dal Pozzo F.	11
Arsieni P.	10, 44	D'Amico V.	16, 23
Beraldo P.	12, 20	De Girolamo A.	29
Bertoia M.	51	della Rocca G.	48
Bielli M.	18	Dellepiane M.	10
Bombardini C.	26	De Murtas R.	16
Bonoli C.	27	De Nigris G.	12
Bossù T.	47	Di Cave D.	20
Bovo G.	32, 45, 50	Di Cicco E.	19
Bozzetta E.	54	Di Nocera F.	47
Brunetti R.	10, 29, 44	Di Salvo A.	48
Buonasera E.	51	Dörr A.J.M.	28
Caffara M.	26, 43	Elia A.C.	28
Calzetta A.	13, 14	Ercolini C.	10
Canestri Trotti G.	16	Esposito A.	52
Capelli G.	15	Fabris A.	40
Capovilla P.	27	Fabrizi L.	52
Cappuccinelli R.	25	Fasolato L.	45, 50
Castiglione F.	22	Fenzi G.A.	17
Caruso G.	46	Ferrantelli V.	22
Ceschia G.	15	Fichtel L.	26
Cherchi S.	25	Figus V.	16, 23
Ciuchini F.	46	Fioravanti ML.	20, 21, 22, 24, 26, 43
Ciulli S.	11	Florio D.	26, 43
Coluccia E.	23	Galeotti M.	12, 51

Galletti E.	11	Minervini F.	29
Galuppi R.	27	Monfrinotti M.	47
Gasparri F.	44	Mosca F.	13, 14
Gatti F.	32	Moscato M.	20
Gelmetti D.	53	Mulas A.	23
Genovese L.	46	Mutinelli F.	29
Ghittino C.	24, 48	Narcisi V.	13, 14
Giagoni A.	25	Nardini G.	18
Gianola C.	10	Natali M.	24, 28
Gioia L.	13	Pacciarini M.L.	53, 55
Guandalini E.	52	Pacini N.	28
Gusmani L.	51	Paladini G.	20
Gustinelli A.	20, 21, 22, 24	Paparella A.	50
Invernizzi S.	21	Pavoletti E.	54
Lai M.G.	25	Pennisi L.	13
Lanni L.	47	Perantoni P.	49
LaPatra S.E	37	Pezzolato M.	54
Latini M.	24	Pistone G.	10
Locatelli L.	41	Pitozzi A.	49
Lorenzen N.	35	Prearo M.	10, 28, 29, 40, 44, 50, 54
Lorenzi M.	32	Quaglio F.	26, 27, 43
Lovaglio G.	24	Qualtieri K.	45, 50
Lucchetti D.	52	Ramirez Tafur R.	15
Magi G.E.	19	Renzoni G.	19
Malvisi J.	48	Rogato F.	12, 43
Mancuso M.	46	Romalde J.L.	39
Manfrin A.	40, 45, 46, 50	Romanò C.	21
Manuali E.	48	Rossi G.	19
Marcer F.	27	Rosteghin M.	45, 50
Marturano S.	44	Salati F.	17, 25
Mascarino D.	54	Salogni C.	49, 53, 55
Midtlyng P.J.	34	Santoro D.	27

Scagliarini A.	11
Scapigliati G.	31
Scaravelli D.	18
Sello M.	15
Sgro L.	15
Shinn A.P.	20
Spiga B.	17
Tagliabue S.	53, 55
Tampieri M.P.	27
Taticchi M.I.	28
Tiberi C.	48
Tiscar P.G.	13, 14
Toller G.	32
Troni V.	28
Vanelli M.	30
Varello K.	54
Vascellari M.	29
Vicari D.	22
Vignoli M.	18
Volpatti D.	40, 51
Zaccone R.	46
Zanoni M.	53, 55
Zentilin A.	15