

# **WORKSHOP**

***“APPROCCIO DIAGNOSTICO, PROFILATTICO E  
TERAPEUTICO NEI CONFRONTI DELLE PRINCIPALI  
PATOLOGIE DEI PESCI D’ACQUARIO”***

## ASPETTI ECONOMICO-COMMERCIALI DEL SETTORE ACQUARIOFILIA

V. De Vita

*Acquario di Bologna, Srl – Ozzano dell'Emilia (BO)*

Dopo la seconda guerra mondiale, il commercio dei pesci tropicali ornamentali ha subito un notevole incremento: il fatturato mondiale attuale è di circa 300 milioni di dollari.

Il giro d'affari è molto interessante anche se le problematiche connesse a questo tipo di mercato sono estremamente peculiari ed ancora non sono disciplinate da adeguate norme legislative aggiornate.

Dalla fine degli anni '50 ad oggi il panorama dell'offerta di pesci è cambiato notevolmente. Alcuni paesi del Sud-Est asiatico (Singapore, Thailandia, Hong Kong) hanno sviluppato una vera e propria industria di riproduzione di pesci ornamentali. Oggi, circa il 90% dei pesci commercializzati viene riprodotto in cattività.

Tra i paesi esportatori primeggiano quelli asiatici, seguiti da Stati Uniti, Olanda, Germania ed alcuni Paesi dell'Europa orientale.

L'attività di riproduzione su vasta scala, tipica dei paesi asiatici, ha prodotto vantaggi di ordine commerciale, ma ha introdotto alcune problematiche di ordine biologico: la selezione genetica, tesa a produrre soggetti identici e standardizzati per taglia e colore e/o varianti dei morfotipi originali selvatici, ha determinato un minore vigore ibrido delle specie: quindi, se da un lato è stata soddisfatta la richiesta di regolarità e novità da parte degli importatori, dall'altra è diminuita di molto la rusticità di alcune tra le specie più commercializzate (Poecilidi, Ciprinidi, Ciclidi). A tutto ciò vanno sommati gli svantaggi derivanti dalla indiscriminata volontà di riduzione dei costi.

Sicuramente l'interesse acquariologico ha ridotto la probabilità di estinzione di alcune specie, determinando benefiche disseminazioni in natura, più o meno accidentali, di soggetti appartenenti a specie scomparse dai biotopi naturali. D'altro canto va ricordato che il rischio di estinzione di alcune specie, non è affatto da imputare all'attività di cattura, ma alla distruzione di alcuni biotopi come conseguenza della deforestazione, della cementificazione e dell'inquinamento.

In alcune regioni del Sud-Est asiatico (Thailandia) si ricorre anche a trattamenti di colorazione artificiale di alcuni pesci: si tratta di una pratica aberrante, anche se vi è una grossa richiesta di questi animali, soprattutto negli stati dove la diffusione della cultura acquariofila è ancora piuttosto rudimentale.

Gli esportatori dell'America latina e dell'Africa offrono invece una vasta gamma di pesci selvatici. In queste aree si è sviluppata una certa industria della stabulazione di soggetti catturati in natura.

In Italia, accanto ad una embrionale attività di produzione industriale, soprattutto di Ciprinidi, risulta essere più florida l'attività di importazione: l'Italia importa per circa 7-8 milioni di euro.

La catena di distribuzione dei pesci ornamentali è estremamente specializzata: essa comprende il produttore/pescatore, l'esportatore, l'importatore/grossista, il dettagliante. Nelle zone tropicali, gli allevatori dispongono di vasche di cemento situate all'aperto, in numero variabile fino ad un massimo di un centinaio. Di solito i produttori professionisti organizzano cicli produttivi di poche specie e non solo di origine asiatica. Le aziende esportatrici hanno come riferimento più realtà produttive specializzate.

Agli esportatori spetta l'organizzazione burocratica ed il confezionamento adeguato alle spedizioni aeree. L'esportazione internazionale per via aerea dei pesci ornamentali

viene disciplinata dal regolamento I.A.T.A. (Associazione Internazionale per il Trasporto Aereo). Dalle prime pionieristiche importazioni, con picchi inaccettabili di mortalità che superavano il 50%, si arriva oggi, con tecnologie specifiche, frutto di anni di sperimentazioni, a risultati migliorati anche di 10 volte.

Le aziende importatrici accolgono i pesci seguendo determinati protocolli che mirano a ridurre l'effetto stressogeno del trasporto, cercando di ospitare gli animali in condizioni chimico-fisiche il più simile possibile a quelle di origine.

Il trasporto, lo stoccaggio ad alte densità, la scarsità e/o la scarsa qualità del cibo somministrato e le cattive condizioni igienico-sanitarie, determinano l'insorgere di alcune patologie opportuniste tipiche e specifiche.

I grossisti più seri, attuano una serie di terapie preventive con lo scopo di immettere sul mercato pesci sicuramente sani.

Per quel che riguarda alcune zoonosi, in Italia l'importazione viene controllata dal servizio veterinario territorialmente competente.

## LA DINAMICA DELL'ACQUARIO

A. Solenne

*Associazione Piemontese Erpetologia ed Acquariologia, Torino*

L'acquario è un complesso ecosistema al cui interno convivono diverse specie animali. Molti sono i fattori che entrano in gioco nella dinamica dell'acquario, ma all'acquariofilo è sufficiente conoscere poche regole fondamentali per poter gestire correttamente questo biotopo in miniatura, sia esso d'acqua dolce o marina. Durante l'intervento verranno descritti i diversi tipi di acquari che è possibile allestire, dando particolare risalto a quelli comunemente più diffusi tra gli appassionati, ovvero quelli d'acqua dolce, che rappresentano circa il 90% degli acquari presenti sul territorio nazionale. Saranno inoltre affrontati argomenti di chimica dell'acqua, analizzando quali sono i principali parametri chimico fisici da misurare e tenere in considerazione, come KH, pH,  $\mu\text{S}$ ,  $\text{NO}_2^-$ , temperatura e quali sono gli errori principali al riguardo da parte dell'appassionato, ma anche di operatori di settore. Spesso infatti il trascurare questi semplici parametri crea problematiche enormi all'acquariofilo, con morte degli ospiti dell'acquario, che erroneamente vanno poi ricercate in patologie complesse che non sono alla base della morte dei pesci. Un approfondimento particolare sarà dedicato ai sistemi di filtraggio, ma soprattutto al principale ciclo biologico che si svolge all'interno dell'ecosistema acquario, il ciclo dell'azoto, alla base del corretto funzionamento del microambiente; verranno presi in considerazione quali batteri intervengono in questo processo e quali sono le principali cause di malfunzionamento degli acquari italiani, fornendo la chiave di lettura per risolvere il problema della maggior parte degli acquari degli appassionati.

## PRINCIPALI ASPETTI DI LEGISLAZIONE SANITARIA NEL SETTORE DEI PESCI ORNAMENTALI

A. Manfrin

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie – Legnaro (PD)*

La legislazione concernente l'allevamento ed il commercio delle specie ittiche ornamentali risulta essere estremamente carente e generica.

La definizione stessa di "pesce ornamentale" non è codificata da nessuna norma nazionale, tanto che si potrebbe parlare di animali da reddito (per i commercianti, sia all'ingrosso che al dettaglio), di animali da compagnia o pet (per l'utilizzatore finale), oppure di pesci ornamentali veri e propri, in quanto ormai sono inseriti nell'arredo, sia dei nostri appartamenti, negozi, locali pubblici che dei nostri giardini o parchi pubblici e privati.

Al momento attuale i controlli igienico-sanitari vengono svolti presso le aziende estere produttrici, sulla base di un'autorizzazione ufficiale rilasciata alle aziende stesse da molti dei Paesi esportatori. Tali controlli, svolti nell'azienda stessa tramite una forma di autocontrollo, risultano spesso parziali e poco affidabili.

L'esportazione internazionale per via aerea dei pesci ornamentali viene disciplinata dal Regolamento I.A.T.A. (Pubblicazione annuale – Associazione Internazionale per il Trasporto Aereo). Tale regolamento è suddiviso in dieci capitoli che descrivono i parametri da rispettare per il trasporto, quali: requisiti dei contenitori su cui vanno apposti i nomi scientifici della specie, certificazione e documentazione necessari per il trasporto di animali vivi, modalità di stivaggio e densità di carico permesse.

In Italia, l'importazione viene controllata dal Servizio Veterinario Pubblico territorialmente competente. Tale servizio deve essere avvertito dall'importatore del momento presunto per l'arrivo delle partite. Il veterinario può (in ambito di piani di vigilanza o per gli scambi intracomunitari) o deve (solo in caso di importazione da Paesi Terzi) effettuare dei controlli sulla certificazione (dati di segnalamento e documentazione sanitaria di accompagnamento), sulle condizioni fisiche dei soggetti trasportati ed eventualmente può stabilire la necessità di svolgere ulteriori esami di laboratorio. In Italia, in seguito all'epidemia di colera e tifo in Malesia, la Direzione Generale dei Servizi Veterinari del Ministero della Sanità, ha emesso il telegramma AG1735 del 28 maggio 1990, con il quale si obbliga il Servizio Veterinario ad effettuare esami batteriologici per la ricerca di *Vibrio cholerae* e *Salmonella typhi* sull'acqua di trasporto e i pesci di partite provenienti esclusivamente dall'Asia. Queste vengono quindi poste sotto vincolo sanitario presso le ditte importatrici e, solo dopo esito negativo degli esami batteriologici, possono essere commercializzate.

L'Italia, però, è l'unico stato europeo in cui vengono effettuati i controlli batteriologici precedentemente descritti, sulle partite di pesci importati non solo dall'Asia, ma anche da numerosi altri Paesi Terzi. Il tentativo di evitare tali indagini, frequentemente determina il formarsi di "triangolazioni commerciali", per cui le partite esportate giungono come prima destinazione a paesi europei, quali Francia, Spagna e Germania e solo successivamente arrivano in Italia. In tal modo la responsabilità dei controlli igienico-sanitari è demandata al Paese ricevente e la partita è libera di essere commercializzata una volta giunta nel nostro Paese.

Recentemente è stato predisposto un D.M., non ancora pubblicato sulla Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana, che prevede precise disposizioni sull'importazione e gli scambi comunitari di pesci ornamentali, i requisiti tecnici ed igienico-sanitari delle aziende importatrici con la relativa dichiarazione di idoneità redatta a cura dell'AUSL competente per territorio e la certificazione sanitaria che dovrà scortare ciascuna partita in entrata nel nostro Paese.

## LE PRINCIPALI PATOLOGIE DI ORIGINE VIRALE NEI PESCI ORNAMENTALI

G. Bovo

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie – Legnaro (PD)*

La diffusione nel territorio di agenti patogeni è causata principalmente dalla movimentazione degli animali non supportata da un corretto controllo sanitario. Nel caso dei pesci tropicali, il rischio di diffusione di patogeni è particolarmente elevato in quanto favorito dalle precarie condizioni sanitarie in cui sono allevati i pesci nella maggior parte dei Paesi di origine e dalla carenza di normative internazionali. In questa situazione i flussi commerciali, da tempo instaurati verso le aree geografiche a maggior sviluppo economico, rappresentano senz'altro un rischio per la diffusione di agenti patogeni esotici. Occorre d'altra parte considerare che la maggior parte dei pesci ornamentali viene mantenuta permanentemente in acquario e che le temperature fisiologiche di questi animali non consentono la loro sopravvivenza in molte parti del globo; ciò non garantisce comunque contro la possibilità di diffusione di taluni patogeni che, eliminati con le acque reflue, raggiungono, prima o dopo, il sistema idrico del territorio dove possono diffondersi con facilità. E' noto infatti che alcuni agenti virali sono estremamente resistenti e possono permanere nell'ambiente acquatico per diversi mesi e mantenere inalterata la propria patogenicità.

Per questo motivo non è assolutamente priva di fondamento l'esigenza di estendere i controlli sanitari anche ai pesci ornamentali, soprattutto per quelle specie che vengono mantenute ed allevate in ambienti esterni ed in quantitativi importanti. La direttiva 91/67/CEE, recepita con il D.P.R. 555/92, disciplina gli aspetti sanitari della commercializzazione dei pesci vivi e normalmente viene applicata per le specie oggetto d'allevamento. Essa comunque costituisce punto di riferimento anche nei riguardi delle specie ornamentali. In particolare, stante la non suscettibilità della stragrande maggioranza delle specie ornamentali commercializzate, alle malattie contemplate nelle liste I e II, la normativa trova applicazione in questo settore, limitatamente per quanto riguarda gli aspetti generali come, ad esempio, l'articolo 3 dove si prevede che gli animali siano immessi al commercio solo se in perfetto stato sanitario. Purtroppo la normativa comunitaria è assolutamente carente per quanto riguarda i pesci ornamentali introdotti da Paesi terzi e risulta pertanto difficile imporre, in importazione, vincoli sanitari specifici. Per sanare questa carenza è auspicabile l'attuazione di una normativa nazionale che stabilisca i criteri minimi per una corretta gestione degli animali importati. Tra le varie misure dovrebbe senz'altro essere inclusa l'attivazione, presso ogni centro d'importazione, di un reparto di quarantena, dove il veterinario d'azienda od il servizio veterinario ufficiale possano seguire le partite di recente introduzione prima di licenziarle al libero commercio. In presenza di rischi biologici gravi, dovrebbe essere imposta una garanzia supplementare con invio a centri di quarantena ufficiali. Se si considera che il rischio non è solo rappresentato da pesci, gameti ed uova embrionate, ma anche dalla stessa acqua di trasporto, si comprende la necessità di dover trattare anche le acque reflue delle vasche di quarantena tramite ozonizzazione o clorazione.

Passando agli aspetti pratici e scorrendo la letteratura specifica, si vede che, a partire dal 1979 ad oggi, sono stati riportati oltre 20 identificazioni di agenti virali da pesci ornamentali. Alcuni di questi agenti possono rappresentare, per la stessa specie o per altre specie, un grave rischio biologico, condizionando l'economia dell'allevamento e/o indirettamente la libera commercializzazione sul mercato internazionale. La

preoccupazione maggiore riguarda l'isolamento, sempre più frequente, di agenti appartenenti alla famiglia Iridoviridae. Due di questi agenti, isolati da pesci tropicali con evidenti segni clinici, si sono dimostrati patogeni, nel corso di prove sperimentali, anche nei confronti di specie estremamente importanti quali la trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*) ed il pesce gatto (*Ictalurus melas*). Per tale motivo gli iridovirus, che in altre classi animali rivestano scarsa importanza patogena, vengono oggi osservati con attenzione particolare.

A partire dal 1998 sono stati inoltre riportati diversi episodi di mortalità che hanno interessato la carpa koi, una varietà di carpa particolarmente apprezzata e costosa che alimenta n fiorente mercato soprattutto in Giappone, USA ed Inghilterra. La malattia è stata descritta per la prima volta in Israele ed USA e ben presto si è diffusa, favorita dagli scambi commerciali, in vari territori ed è ora presente in USA, Regno Unito, Sud Africa, Germania, Belgio ed Olanda. Nel nostro Paese so no stati identificati alcuni episodi sospetti per i quali, purtroppo, non è stato possibile effettuare una conferma diagnostica. L'aspetto che maggiormente preoccupa è la possibilità di trasmissione della malattia dalla carpa koi alla carpa comune (*Cyprinus carpio*); in Israele e recentemente in Germania infatti, sono stati riportati alcuni gravi episodi di malattia in allevamenti di carpe. Le principali lesioni dell'herpesvirosi della carpa koi sono a carico delle branchie, dove si osservano fenomeni di iperplasia e necrosi, con distruzione delle lamelle branchiali.

Un'ulteriore patologia che colpisce i ciprinidi ornamentali è la Viremia Primaverile della Carpa (SVC), che da sola od associata alla eritrodermatite, può causare seri danni all'allevamento dei pesci rossi (*Carassius auratus*). Recentemente la SVC è stata identificata in North Carolina (USA), dove ha causato seri problemi in allevamenti di carpe koi.

## LE PRINCIPALI PATOLOGIE DI ORIGINE BATTERICA NEI PESCI ORNAMENTALI

M. Prearo

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle D'Aosta – Sezione di Torino – Ittiopatologia e Acquacoltura; Via Bologna 148 – 10154 Torino*

Esistono numerosi modi di classificare le malattie; la più semplice è quella che divide le patologie in contagiose e non contagiose. Nelle prime, le alterazioni funzionali sono determinate da microrganismi più o meno facilmente trasmissibili da soggetto a soggetto. Le malattie contagiose o infettive, possono ulteriormente essere suddivise in: patologie primarie, sostenute da agenti eziologici dotati di un elevato potere patogeno e poco o per nulla condizionate da fattori predisponenti; patologie secondarie o condizionate, dove l'insorgenza della malattia è favorita da condizioni stressanti, quali il sovraffollamento, l'iperalimentazione, le frequenti manipolazioni o quant'altro riduca le difese naturali del pesce; complicanze patologiche rappresentate da un gruppo particolare di patologie secondarie, le quali sono sostenute da microrganismi ubiquitari ed opportunisti, che si instaurano su lesioni preesistenti di varia natura.

Le malattie batteriche, rappresentate da infezioni batteriche interne (setticemie batteriche) ed esterne (malattia branchiale, erosioni cutanee e delle pinne), costituiscono la maggiore causa di mortalità nei pesci: anche in acquario le patologie di origine batterica risultano essere tra le cause di morte di maggiore rilevanza.

L'estrema diffusione dei batteri, associata a condizioni particolari che si verificano in uno spazio ristretto come quello dell'acquario, privo di scambi idrodinamici, può portare alla comparsa ed all'esacerbazione di problematiche a volte facilmente risolubili, altre invece che colpiscono pesantemente, con alta mortalità dei soggetti presenti. Inoltre, tali problematiche possono essere causate dalla coabitazione di specie diverse, provenienti da ambienti differenti.

Infine, considerando le nuove modalità di acquisto dei pesci ornamentali, direttamente dai Paesi d'origine alle vasche dei negozianti, senza più passare da intermediari (transshipping), negli acquari arrivano pesci che non hanno subito un congruo periodo di acclimatamento ed eventuali cure, utili per evitare la diffusione di patologie anche di origine batterica. Gli animali venduti in queste condizioni, spesso presentano patologie di natura batterica, causate anche da germi opportunisti, che possono condurli a morte e, qualora vengano immessi in coabitazione con altri pesci, possono infettare i soggetti sani.

La diagnosi non è sempre facile da effettuarsi, in quanto molte volte i pesci d'acquario muoiono senza aver presentato una sintomatologia ben specifica. Bisogna procedere al prelievo nel più breve tempo possibile dalla morte del pesce per non incorrere in problemi di non idoneità del campione stesso alle analisi (fenomeni di decomposizione) e per evitare che germi di irruzione secondaria, presenti nell'ambiente o nell'intestino del pesce possano passare negli organi interni, contaminandoli. Per evitare quindi difficoltà di interpretazione dei risultati ottenuti, la diagnosi dovrebbe essere condotta presso dei laboratori specialistici, i quali sono in grado di determinare l'agente eziologico e saggiare l'efficacia in vitro di alcuni farmaci mediante l'approntamento di un antibiogramma.

Facendo riferimento allo schema tassonomico dei manuali del Bergey, le patologie batteriche possono essere suddivise in infezioni da germi gram negativi ed infezioni da germi gram positivi.

### Infezioni da germi Gram negativi

La maggior parte delle patologie riscontrabili in pesci ornamentali sono riconducibili a malattie sostenute da germi Gram negativi.

Una patologia conosciuta da molto tempo è la cosiddetta malattia colonnare, sostenuta da germi appartenenti al genere *Flavobacterium* che colpiscono la cute di numerose specie ittiche; particolarmente colpiti da tale malattia sono i Poecilidi ed i Ciclidi. *F. columnaris* determina vere e proprie erosioni a livello cutaneo e delle pinne, causando anche gravi lesioni che possono portare alla morte i soggetti colpiti in poco tempo. La cronicizzazione delle lesioni sortisce invece in evidenti cicatrici. Anche la Malattia Branchiale può essere sostenuta da germi appartenenti al genere *Flavobacterium*, di irruzione secondaria su lesioni primarie causate da parassiti o da agenti di natura chimico-fisica e provoca pesanti mortalità nei pesci ornamentali.

La famiglia delle Pseudomonadaceae è rappresentata da germi ubiquitari, presenti nell'ambiente acquatico che in determinate circostanze, possono essere causa di patologie di irruzione secondaria su preesistenti lesioni di varia natura. Le specie di tale famiglia più isolate nei pesci d'acquario sono *P. fluorescens* e *P. putida*.

Le malattie batteriche sostenute da germi appartenenti alla famiglia delle Enterobacteriaceae sono patologie che colpiscono solo determinate famiglie di pesci ornamentali ed il loro reale ruolo patogeno a volte è messo in discussione da alcuni autori. Tra questi, il *Citrobacter freundii*, isolato in Ciclidi e la *Serratia liquefaciens*, sono germi considerati ubiquitari e che possono fungere da germi opportunisti e causare anche mortalità in determinate condizioni. *Yersinia ruckeri* invece, considerata come patogeno primario per i Salmonidi, può colpire alcuni Ciprinidi.

Il genere *Edwardsiella* invece comprende germi patogeni primari anche per i pesci d'acquario, soprattutto per Ictaluridae, Callichthyidae o Loricariidae, ma che colpiscono anche altre specie ornamentali, come ad esempio *Betta splendens*, determinando forme setticemiche caratteristiche. La specie batterica di maggior interesse appartenente a tale genere è *E. tarda*, ma si segnalano numerosi casi anche sostenuti da *E. ictaluri*.

Senza alcun dubbio i germi appartenenti alla famiglia delle Vibrionaceae sono quelli che causano i maggior problemi ai pesci d'acquario, sia marini che dulciacquicoli. Al genere *Vibrio* appartengono numerose specie batteriche che possono essere implicate in patologie specifiche dei pesci. Tra questi rivestono un reale ruolo patogeno *V. anguillarum*, *V. vulnificus* e *V. alginolyticus*. Molte altre specie sono considerate potenzialmente patogene per le specie ornamentali, anche se le segnalazioni sono in numero molto più ridotto rispetto alle precedenti (*V. parahaemolyticus*, *V. mimicus*, *V. harvei*, *V. ordalii*, ecc.). Scarsamente patogeno per i pesci invece appare il *V. cholerae*. Alla stessa famiglia appartiene anche il genere *Photobacterium* con la specie *P. damsela*. E' un germe patogeno per i pesci, soprattutto con la sottospecie *P. damsela piscicida* che colpisce le specie marine, causando una grave setticemia spesso a carattere acuto.

Sempre tra le Vibrionaceae si annovera il genere *Aeromonas* tra i possibili patogeni dei pesci. Gli appartenenti a questo genere, sono germi generalmente ritenuti come ubiquitari e solo occasionalmente possono causare gravi patologie; vengono generalmente considerati germi di irruzione secondaria, complicanti altre situazioni. La specie maggiormente implicata è *A. hydrophila*, la quale risulta essere la specie batterica più frequentemente isolata da pesci d'acquario, ma vengono coinvolte anche *A. sobria* e *A. caviae*. Anche *A. salmonicida*, agente della furunculosi, può essere causa di lesioni cutaneo-muscolari in Ciprinidi, del tutto simili a quelle presenti nei salmonidi.

Infine, la specie *Plesiomonas shigelloides*, appartenente anch'essa alla suddetta famiglia, è stata più volte isolata come patogeno in diverse specie ornamentali. E' un

germe presente comunemente nell'acqua, che può essere associato a diverse forme a carattere gastroenterico nei pesci, soprattutto provenienti dalle regioni tropicali e sub-tropicali.

#### Infezioni da germi Gram positivi

Le infezioni sostenute da germi Gram positivi non sono particolarmente frequenti nei pesci d'acquario. Alcuni germi cocchi Gram positivi possono causare gravi danni soprattutto a Ciclidi. Sono state segnalate infezioni da *Streptococcus iniae* e *S. agalactiae* soprattutto in tilapie e in alcuni pesci marini.

Altre segnalazioni da germi Gram positivi nei pesci d'acquario sono date da batteri appartenenti al genere *Nocardia* che causano infezioni nodulari croniche molto simili alle micobatteriosi. Le specie isolate sono *N. asteroides* e *N. kampfchi* e sono state segnalate infezioni in *Barbus tetrazona*, *Trichogaster trichopterus*, *Poecilia reticulata*, *Paracheiroidon innesi* ed altri ancora.

Altri germi Gram positivi, facenti parte anch'essi, come il genere precedente, dei batteri acido-alcool resistenti, sono quelli responsabili delle micobatteriosi, i quali saranno trattati in una relazione a parte.

Come si è potuto evincere da quanto sopra esposto, i germi responsabili di patologie più o meno conclamate nei pesci ornamentali, possono, almeno potenzialmente, essere molteplici. Infatti manca per alcuni di essi segnalazioni specifiche nelle varie specie d'acquario. Resta da ricordare che tali pesci provengano per la maggior parte da Paesi dove esiste tuttora un rischio sanitario elevato, soprattutto per alcune malattie. Da ciò il rischio di importare in territorio europeo potenziali agenti patogeni esotici per le nostre specie ittiche, ma soprattutto di introdurre germi potenzialmente pericolosi per l'uomo come *Vibrio cholerae*, con implicazioni in sanità pubblica.

## LE MICOBATTERIOSI O TUBERCOLOSI ATIPICHE: PATOLOGIE EMERGENTI NEI PESCI ORNAMENTALI

R.G. Zanoni

*Università degli Studi di Bologna – Facoltà di Medicina Veterinaria – Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale – Ozzano dell’Emilia (BO)*

In ittiopatologia il termine “Micobatteriosi” o “Tubercolosi” indica un complesso di malattie sistemiche ad andamento cronico, sostenute da batteri appartenenti al genere *Mycobacterium*, riscontrate principalmente nei pesci d’acquario, ma anche nei selvatici ed in quelli allevati per consumo alimentare. Queste patologie, nel loro aspetto tipico, sono caratterizzate dalla presenza di noduli disseminati negli organi interni. Secondo alcuni autori sarebbe opportuno utilizzare il termine “Tubercolosi” solo nelle forme in cui è possibile evidenziare lesioni granulomatose, ed il termine “Micobatteriosi” per tutte quelle in cui tali lesioni non sono presenti, sebbene venga isolato il genere *Mycobacterium*. Attualmente si tende ad utilizzare sempre il termine “Micobatteriosi”, al fine di non creare confusione anche con l’evento morboso dell’uomo e degli altri animali.

Le specie più frequentemente isolate tra i pesci marini e dulciacquicoli sono *M. marinum*, *M. fortuitum*, *M. chelonae* e, in minor misura, altre specie quali ad esempio *M. terrae complex* e *M. gordonae*. Molti di questi microrganismi si trovano normalmente negli ambienti acquatici.

Le micobatteriosi ittiche hanno generalmente un decorso cronico che può richiedere mesi o addirittura anni prima che si evidenziano sintomi. Nelle fasi avanzate si possono osservare anoressia, letargia, emaciazione fino a cachessia, esoftalmo spesso accompagnato da cheratite, ulcere cutanee a carattere emorragico, decolorazione della livrea, sfrangiamento delle pinne, desquamazione e, meno frequentemente, deformità scheletriche. La sintomatologia può manifestarsi con segni clinici differenti a seconda della specie colpita e delle condizioni ambientali. Da un punto di vista anatomopatologico le lesioni macroscopiche più rappresentative sono costituite da noduli miliari biancastri soprattutto a carico di milza, fegato e rene. Si possono inoltre osservare peritonite, ascite e presenza di pseudomembrane sui visceri. Il quadro istologico è caratterizzato dalla presenza di granulomi tubercolari delimitati da una capsula connettivale contenente cellule epitelioidi. La reazione infiammatoria è debole ed in alcuni casi assente, le cellule giganti plurinucleate ed i depositi di calcio sono rari. L’infezione può avvenire per ingestione di alimenti ed acqua contaminati con materiale fecale, urine od essudati provenienti da animali malati. Le fonti e le modalità dell’infezione micobatterica nei pesci possono essere correlate anche ad infezioni di invertebrati, quali artropodi o gasteropodi d’acqua dolce. Inoltre, è da considerare anche la possibilità di ingresso del patogeno attraverso lesioni della cute e delle pinne dovute a ferite od infezioni parassitarie. Recentemente è stata dimostrata la trasmissione di micobatteri in pesci combattenti (*Betta splendens*) attraverso passaggio transovarico. Il manifestarsi della malattia sembra essere legato a fattori gestionali, quali *in primis* una scadente qualità dell’acqua e degli alimenti ed una elevata densità di popolazione in vasca, che sono in grado di determinare un grave stato di stress con conseguente riduzione delle normali resistenze.

Una diagnosi presuntiva si basa sul rilievo dei segni clinici e delle lesioni anatomopatologiche, seguito da un esame batterioscopico condotto secondo la metodica di Ziehl-Neelsen e dall’esame istologico. La diagnosi definitiva prevede l’isolamento e

l'identificazione del microrganismo. Prima di procedere all'esame colturale, spesso è necessario sottoporre il campione a decontaminazione selettiva per ridurre il numero di batteri contaminanti a rapida crescita. L'identificazione delle varie specie di micobatteri prevede l'esecuzione di un adeguato numero di test colturali e biochimici. La messa a punto di misure preventive nel controllo delle micobatteriosi è particolarmente importante, a causa delle difficoltà di trattamento terapeutico.

Da oltre 50 anni si conosce il carattere zoonosico del *M. marinum*. La lesione iniziale, in genere singola, si presenta come un nodulo cutaneo rosso o rosso-bluaastro, di consistenza molle e di diametro variabile fino a 5-6 cm. Il nodulo può successivamente ulcerare o andare incontro a colliquazione con successiva fistolizzazione esterna, oppure può conservare una superficie verrucosa. Raramente le lesioni sono multiple o disseminate al tronco ed agli arti, salvo che in soggetti immunocompromessi. Di frequente si osservano forme sporotricoidi con diversi noduli lungo le linee di drenaggio linfatico. Per quanto riguarda le implicazioni sulla salute pubblica, *M. fortuitum* e *M. chelonae* sono ritenuti patogeni opportunisti di raro riscontro nell'uomo, con infezioni che normalmente coinvolgono la cute in seguito a contaminazione di lesioni superficiali da parte di acqua o pesci infetti.

E' da sottolineare che le infezioni da micobatteri "non tubercolari" hanno fatto registrare negli ultimi anni un preoccupante aumento di casi anche nei paesi industrializzati, in seguito alla diffusione dell'infezione sostenuta da HIV o comunque in pazienti con alterazioni della risposta immunitaria. I pesci ornamentali infetti da *M. marinum*, *M. fortuitum* e *M. chelonae* possono quindi rappresentare una fonte d'infezione.

## LE PRINCIPALI PATOLOGIE DI ORIGINE PARASSITARIA NEI PESCI ORNAMENTALI

M.L. Fioravanti

*Università degli Studi di Bologna – Facoltà di Medicina Veterinaria – Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale – Ozzano dell’Emilia (BO)*

La presenza di parassiti rappresenta un’evenienza comune e non casuale in animali acquatici che vivono allo stato naturale in habitat dulciacquicoli e marini. In tali condizioni risulta raro poter associare un ruolo patogeno ben definito al parassita, rilevando raramente nell’ospite stati di sofferenza ad esso correlabili. Qualora un pesce parassitato si venga però a trovare in una situazione di cattività costringitiva, quale tipicamente l’acquario, questa condizione di equilibrio verrà facilmente rotta, consentendo l’instaurarsi di una fase morbosa del parassitismo con esito più o meno grave, a seconda del tipo di parassita coinvolto e delle condizioni di benessere dell’ospite.

I fattori che più facilmente possono favorire lo sviluppo di una malattia parassitaria all’interno di un acquario sono: a) fattori abiotici, rappresentati dalle condizioni ambientali interne all’acquario quali *in primis* temperatura, ossigeno, pH, ammoniaca, ecc., che possono influenzare sia la capacità replicativa, invasiva e di sopravvivenza dei parassiti, sia il benessere fisiologico dei pesci; b) fattori biotici, relativi fondamentalmente all’ospite (es. le condizioni di nutrizione e di immunocompetenza, l’età, la specie, ecc.) ed al parassita (es. la patogenicità intrinseca, il tipo di ciclo biologico, la velocità di replicazione).

In linea di massima i parassiti che più comunemente colonizzano e causano malattia nei pesci d’acquario sono rappresentati da protozoi, elminti e crostacei scarsamente ospite-specifici ed a ciclo diretto, che non necessitando cioè di alcun ospite intermedio, possono diffondersi facilmente da un pesce all’altro, soprattutto in condizioni di cattività in spazi ristretti.

Tipico esempio ne sono il ciliato *Ichthyophthirius multifiliis*, agente eziologico della Ictioftiriasi o “malattia dei punti bianchi” in pesci dulciacquicoli, ed il ciliato *Cryptocaryon irritans* ed il dinoflagellato *Amyloodinium ocellatum*, responsabili rispettivamente della Criptocarionosi e della Amiloodiniasi o “malattia del velluto” in pesci marini. Questi protozoi trovano nell’acquario le condizioni ottimali per il proprio sviluppo, replicando facilmente sul fondo e sui substrati sommersi e presentando un ciclo di sviluppo tanto più rapido quanto più la temperatura si avvicina a valori intorno a 25° C. Similmente fra i monogenei, elminti ectoparassiti a ciclo diretto, numerosi generi delle famiglie Dactylogyridae, Gyrodactylidae e Capsalidae possono diffondersi rapidamente nella popolazione dell’acquario, soprattutto in condizioni di sovraffollamento, andando a determinare gravi infestazioni branchiali e cutanee.

La possibilità che alcuni parassiti a ciclo indiretto possano trovare in acquario gli ospiti intermedi utili al completamento del loro ciclo biologico, non va comunque esclusa. Ad esempio, gli stadi larvali infettanti di nematodi del genere *Capillaria* e *Camallanus* e di cestodi del genere *Bothriocephalus* si sviluppano all’interno di crostacei copepodi, a volte utilizzati come alimento, così come quelli di alcuni mixosporidi quali *Sphaerospora* e *Ceratomyxa* evolvono in anellidi oligocheti bentonici che possono essere presenti nel materiale di fondo.

Infine, in considerazione del fatto che l’ambiente dell’acquario rappresenta in termini generali un habitat ottimale per l’amplificazione riproduttiva e la colonizzazione di

organismi acquatici ubiquitari quali protozoi commensali del genere *Trichodina* o funghi saprofiti del genere *Saprolegnia*, va sempre tenuta presente la possibilità che molti organismi opportunistici riescano ad agire da veri e propri parassiti in condizioni di scadente qualità dell'acqua e di abbassamento delle difese immunitarie del pesce.

Pur non dovendo mai sottovalutare l'importanza del controllo dei soggetti di nuova introduzione, operando, quando possibile la quarantena, al fine di non introdurre patogeni parassitari in acquario, sarà quindi importante applicare un'accurata valutazione dei fattori di rischio abiotici e biotici che possono permettere l'instaurarsi di una patologia parassitaria.

Poiché l'acquario rappresenta in piccola scala un ecosistema acquatico complesso e delicato, solo il funzionamento di tutte le sue componenti ed il controllo dei fattori di rischio permetteranno di assicurare quell'equilibrio tra ospite, parassita ed ambiente, utile a prevenire le malattie e ad evitare l'uso di metodi di controllo chimico spesso distruttivi e poco efficaci.

## PRINCIPI DI PROFILASSI E TERAPIA NEI PESCI D'ACQUARIO

G. Mosconi

*Libero Professionista, Bologna*

### Avvertenze da anteporre all'uso di medicinali.

Quando possibile è sempre meglio effettuare un trattamento separato con poca acqua esattamente determinabile = dosaggio del farmaco più preciso + minori costi + rapidità del ripristino delle condizioni ottimali.

Il livello di tossicità di svariati medicinali per i pesci, è molto vicino alla dose terapeutica.

Le caratteristiche chimico-fisiche dell'acqua influenzano l'efficacia e la tossicità del trattamento.

E' conveniente con le specie di pesci che tollerano più elevate temperature effettuare trattamenti termici.

Acque con pH inferiore a 7 e durezza carbonatica inferiore a 4 d° di KH, rendono più aggressivi i chemioterapici; in vasche con tali caratteristiche utilizzare dosaggi leggermente inferiori.

Quando si effettua una terapia in acquario si deve tenere presente che molti farmaci possiedono un'attività battericida, che può provocare la morte del filtro. È conveniente, quindi, "alleggerire" la carica biologica (attiva e passiva) del filtro.

La presenza di eventuali lampade a luce ultravioletta può provocare una modifica alla struttura chimica di alcuni medicinali disciolti, per questo motivo bisogna sempre spegnere le apparecchiature UV durante i trattamenti nell'acquario.

I bagni brevi (solitamente effettuati con dosaggi più elevati), non devono essere praticati nell'acquario arredato: muoiono le piante, gli invertebrati e tutti i batteri del filtro.

Negli acquari di comunità bisogna prestare particolare attenzione ai pesci di fondo (Siluriformi) ed ai pesci di branco come i Caracidi, nonché ai Ciclidi nani.

In presenza di due patologie concomitanti è sconsigliabile utilizzare due curativi contemporaneamente. Si curerà prima la patologia più pericolosa, dopodiché i soggetti verranno lasciati riposare per 3-4 giorni, effettuando più cambi parziali di acqua, la riattivazione del filtro e l'applicazione di carbone attivo; a questo punto si potrà procedere ad una seconda terapia.

Alcuni medicinali contengono degli eccipienti (sostanze veicolanti) che provocano una moltiplicazione batterica abnorme con intorbidimento dell'acqua e consumo notevole di ossigeno.

L'aggiunta di medicinale non dovrà avvenire di sera, per poter osservare eventuali manifestazioni d'affaticamento organico e d'intossicazione.

Terminato il trattamento si provvede ad un cambio parziale dell'acqua (mai oltre il 20% per volta), all'inserimento del carbone attivo e all'integrazione di colture selezionate di batteri per il filtro.

# **COMUNICAZIONI SCIENTIFICHE**

## **INDAGINI RELATIVE ALLA SENSIBILITÀ DELLA METODOLOGIA DIAGNOSTICA PREVISTA DALLA DECISIONE 2001/183/CE, CON PARTICOLARE RIFERIMENTO ALL'ALLESTIMENTO DI CAMPIONI COLLETTIVI : RISULTATI PRELIMINARI**

L. Selli<sup>1</sup>, G. Toller<sup>2</sup>, M. Lorenzi<sup>2</sup>, A. Manfrin<sup>1</sup>, E. Cappellozza<sup>1</sup>, D. Ferro<sup>1</sup>, R. Quartesan<sup>1</sup>, G. Bovo<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie – Legnaro - PD*

<sup>2</sup> *Azienda Provinciale per i Servizi Veterinari di Trento - Ambito territoriale n. 5 – Tione*

Il riconoscimento di aziende e zone indenni da Setticemia Emorragica Virale e Necrosi Ematopoietica Infettiva si fonda su programmi di controllo pluriennali basati sull'assenza di sintomatologia clinica e negatività dei controlli virologici previsti. Le aziende, in possesso dei requisiti strutturali minimi e con due anni di assenza di segni clinici, vengono sottoposte a due campionamenti annuali di 150 soggetti cadauno per due anni consecutivi. Le aziende che risultano negative possono conseguire lo *status* di azienda riconosciuta, ai sensi del DPR 555/92. Ciascun campione di 150 soggetti viene suddiviso in 15 campioni di 10 soggetti cadauno e da essi viene eseguito un pool di organi, unendo frammenti di rene, milza, cervello e cuore da ciascuno dei 10 soggetti. I campioni così preparati vengono omogenati, trattati con antibiotici e con siero anti NPIV (virus della Necrosi Pancreatica Infettiva), inoculati su colture cellulari e controllati regolarmente per rivelare od escludere la comparsa di effetto citopatico, indice di presenza virale. Negli ultimi tempi è sorto il sospetto che, in situazioni di episodi cronici, soprattutto in popolazioni sub-adulte o adulte, l'allestimento di campioni collettivi, così come previsto dalla decisione 2001/183/CE, possa presentare limiti significativi ai fini dell'isolamento dell'agente eziologico. Infatti la presenza contemporanea, nella stessa popolazione, di soggetti positivi per anticorpi specifici ed altri positivi al virus, oppure la presenza di pochi soggetti positivi al virus a basso titolo, potrebbe mascherare il risultato delle indagini virologiche, eseguite in forma di campioni collettivi, nel primo caso per neutralizzazione *in vitro* del virus presente o, nel secondo caso, per eccessiva diluizione virale. Al fine di verificare tali possibilità si è ritenuto opportuno condurre un'indagine sottoponendo all'esame virologico, sia i singoli campioni che i rispettivi campioni collettivi, seguendo la metodologia prevista dalla decisione 183/2001/CE. Per questo motivo, sono stati raccolti 60 soggetti, presso un impianto in cui recentemente era stato isolato il virus della NEI in assenza di segni clinici. Da ogni soggetto è stato allestito un campione a partire da rene, milza, cuore e cervello; i 60 pool di organi dei singoli soggetti sono stati analizzati virologicamente su cellule BF-2 ed EPC. Da ogni soggetto è stato inoltre prelevato un campione di siero su cui è stata eseguita la ricerca del titolo anticorpale mediante test di sieroneutralizzazione. Contemporaneamente sono stati allestiti 6 campioni collettivi unendo i pool degli organi dei soggetti 1-10, 11-20, 21-30, 31-40, 41-50 e 51-60 che sono stati analogamente analizzati su cellule BF-2 ed EPC. Nel corso delle indagini è stato possibile isolare il virus della NEI dai pool di organi dei soggetti n. 38 e n. 41, mentre nessuna positività è stata osservata nei sei campioni collettivi. Per quanto concerne l'esame sierologico è stata evidenziata attività neutralizzante significativa (titolo = 1:320) in un unico soggetto. Questi risultati, se pur preliminari, evidenziano la possibilità reale che, nelle indagini routinarie, eseguite secondo la metodologia prevista dalla decisione 2001/183/CE, si possa verificare una mancata identificazione di campioni positivi per il virus della NEI. Per questo motivo si ritiene di particolare interesse continuare le indagini e, se possibile, identificare le possibili cause.

## **SENSIBILITÀ DELLA TROTA MARMORATA (*SALMO TRUTTA MARMORATUS*) NEI CONFRONTI DELLA SETTICEMIA EMORRAGICA VIRALE E NECROSI EMATOPOIETICA INFETTIVA: OSSERVAZIONI PRELIMINARI**

F. Borghesan, L. Selli, E. Schiavon, A. Manfrin, E. Cappellozza, R. Quartesan, G. Bovo

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie , Legnaro -Padova. ITALY*

La trota marmorata (*Salmo trutta marmoratus*) ha ricevuto, negli ultimi anni, particolare attenzione da parte di ittiologi ed enti pubblici interessati alla gestione delle acque interne che hanno attivato vari programmi di selezione genetica mirati al ripopolamento dei corsi d'acqua naturali.

Di questa specie, caratterizzata da un'areale di diffusione relativamente limitato, non si hanno sufficienti informazioni relative alla sensibilità nei confronti delle patologie che colpiscono gli altri salmonidi ed, in particolare, non vi sono segnalazioni relative alle malattie virali incluse nella lista II dell'allegato A del DPR 555/92.

Per tale motivo, si è ritenuto opportuno avviare alcune indagini sperimentali di sensibilità nei confronti della Setticemia Emorragica Virale (SEV) e della Necrosi Ematopoietica Infettiva (NEI). Allo scopo si sono costituiti tre distinti gruppi di avannotti di trota marmorata di circa 3 mesi di età, sottoposti rispettivamente ai seguenti trattamenti : gruppo A, costituito da due sottogruppi di 50 soggetti ciascuno infettati, tramite immersione, con un ceppo di riferimento del virus della SEV; gruppo B, costituito da due sottogruppi di 50 soggetti ciascuno infettati, tramite immersione, con un ceppo di riferimento del virus della NEI ; gruppo C, costituito da due sottogruppi di 50 soggetti ciascuno utilizzati come controllo negativo. Parallelamente, allo scopo di avere un parametro di riferimento, la stessa prova è stata condotta utilizzando tre gruppi di avannotti di trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*) di pari età.

Al termine dell'infezione gli animali sono stati stabulati in acquari di 50 litri riforniti con flusso continuo di acqua di rete dechlorata e mantenuta alla temperatura di 10° C . Ogni acquario è stato ispezionato giornalmente, per accertare la comparsa di sintomatologia e/o mortalità. I soggetti deceduti sono stati raccolti giornalmente e mantenuti a -20° C fino all'inizio delle indagini di laboratorio. Le osservazioni cliniche sono state protratte per 30 giorni e, al termine di questo periodo, tutti i soggetti deceduti o sopravvissuti sono stati sottoposti ad indagine virologica.

I risultati ottenuti suggeriscono che la trota marmorata sia più resistente della trota iridea , nei confronti della SEV mentre, per quanto riguarda la NEI, non sono state riscontrate differenze significative.

## GRAVE EPISODIO DI ENCEFALO-RETINOPATIA VIRALE IN AVANNOTTI DI SOGLIOLA (*SOLEA SOLEA*) D'ALLEVAMENTO

F. Borghesan<sup>1</sup>, R. Palazzi<sup>2</sup>, L. Zanella<sup>2</sup>, M. Vascellari<sup>1</sup>, F. Mutinelli<sup>1</sup>, F. Montesi<sup>1</sup>, A. Manfrin<sup>1</sup>, L. Selli<sup>1</sup>, G. Bovo<sup>1</sup>

1- Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro -Padova

2- Veneto Agricoltura, 35020 Legnaro -Padova.

Nel corso dell'estate 2002 è stato osservato, in un impianto di acquacoltura di specie eurialine, situato nel nord Adriatico, un grave episodio di mortalità che ha interessato una popolazione di avannotti di sogliola comune (*Solea solea*) associato alla presenza del virus della Encefalo-retinopatia. La presenza del virus nell'azienda era stata precedentemente identificata in una partita di avannotti di ombrina (*Umbrina cirrosa*) che aveva presentato, nello stesso periodo, un'elevata mortalità, associata a sintomatologia di tipo nervoso, compatibile con quanto descritto precedentemente (Pavoletti et al., 1998). In breve tempo l'infezione si è diffusa alla maggior parte delle vasche dove erano allevate le sogliole, causando perdite significative. I soggetti colpiti evidenziavano un comportamento natatorio anomalo alternato a lunghi periodi di immobilità sul fondo, dove rimanevano talvolta in posizione capovolta. L'episodio si è concluso nell'arco di un mese. Durante questo periodo la temperatura ha oscillato intorno a valori di 20-27° C.

Un campione di 10 soggetti è stato fissato in formalina al 10% ed inviato al laboratorio insieme ad altrettanti soggetti mantenuti refrigerati. Questi ultimi sono stati sottoposti ad esami parassitologici, batteriologici e virologici. Accanto ai metodi diagnostici tradizionali è stata utilizzata anche una metodica di PCR per la ricerca del virus della Encefalo-retinopatia.

I risultati ottenuti hanno evidenziato la presenza di lesioni vacuolari a carico dei neuroni. Inoltre, nel cervello e nella retina, è stata evidenziata la presenza di aggregati multifocali di cellule macrofago-like.

Questi aggregati cellulari sono risultati fortemente positivi mediante IHC con impiego di siero anti virus della VER. I monostrati di SSN-1 inoculati con gli omogenati dei cervelli ha evidenziato la comparsa di effetto citopatico caratteristico per la presenza di vacuolizzazione cellulare. Le indagini eseguite tramite M.E. hanno evidenziato la presenza di particelle virali del diametro di 25 nm. La presenza del virus è stata confermata anche dalla PCR.

I risultati osservati confermano la patogenicità dell'agente della VER nei confronti della sogliola e suggeriscono che i pesci piatti, come il rombo chiodato (*Scophthalmus maximus*) e l'ippoglossio (*Hippoglossus hippoglossus*) siano specie altamente sensibili alla VER (Bloch et al., 1991; Grotmol et al., 1995).

La comparsa inoltre, nel corso dell'estate 2003, di un nuovo episodio di VER a carico della stessa popolazione di sogliole sopravvissute all'episodio dell'anno precedente, indica che l'infezione non sempre è in grado di conferire una risposta immunitaria sufficiente a coprire tutto il ciclo d'allevamento.

## ANALISI DELLA SEQUENZA AMMINOACIDICA DELLA PROTEINA DEL CAPSIDE IN *BETANODAVIRUS*

S. Ciulli, M. Battilani, A. Scagliarini, S. Properi

*Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale, Università di Bologna.*

L'infezione da *Betanodavirus* è responsabile di una patologia a sintomatologia nervosa in varie specie ittiche d'allevamento. La malattia, emersa recentemente, e il suo agente causale sono sottoposti a molteplici studi, ma non sono ancora disponibili efficaci mezzi terapeutici o profilattici che permettano di limitare i danni causati dai ricorrenti episodi di mortalità. Le tecniche di profilassi diretta sembrano avere dato buoni risultati nelle avannotterie, dove, le condizioni ambientali strettamente controllate, permettono di tenere sotto controllo l'infezione con adeguate misure di disinfezione e il controllo delle acque di entrata e dei riproduttori. L'allevamento sia estensivo sia intensivo del branzino per il consumo alimentare, invece, non permette l'applicazione di queste rigide misure di controllo essendo in genere formato da bacini naturali o gabbie ad immersione dove il pesce allevato è in stretto contatto con l'ambiente naturale. La mancanza, quindi, di barriere naturali rende impossibile l'applicazione di misure di profilassi diretta per il controllo della patologia. Queste difficoltà hanno incentivato l'interesse verso lo sviluppo di un'efficace profilassi vaccinale. La proteina del capsido codificata dall'RNA2 è l'unico peptide ad attività immunogena, poché, però sono le conoscenze riguardo alle caratteristiche antigeniche di questa proteina. Lo studio del gene codificante per la proteina del capsido ha evidenziato una prima regione ad elevato numero di residui basici che, in analogia con la proteina del capsido degli *Alphanodavirus*, sarebbe il sito di interazione con l'RNA virale. Sono state poi individuate due regioni caratteristiche all'interno del genoma, una costante, tipica dei *Betanodavirus*, e una variabile caratteristica del genotipo virale; purtroppo la scarsissima (28,6%) identità di sequenza con il gene della proteina omologa degli *Alphanodavirus* non permette di azzardare analogie funzionali o conformazionali fra le proteine dei due generi. Questo lavoro ha lo scopo di analizzare le caratteristiche antigeniche della proteina del capsido di ceppi di *Betanodavirus*. A tale fine, le sequenze amminoacidiche primarie sono state analizzate con l'algoritmo AMPHI, per la predizione dei siti antigenici immunodominanti stimolanti i linfociti T helper e con l'algoritmo SETTE, per la predizione dei siti antigenici che interagiscono con i complessi di istocompatibilità di classe II MHC. E' stato inoltre valutato l'indice antigenico con il metodo di Jameson-Wolf. Tutti i metodi sono implementati nel programma Protean (DNASTAR, Lasergene, USA). Per questa analisi sono state utilizzate sequenze proteiche ottenute da ceppi isolati presso il nostro laboratorio e sequenze amminoacidiche selezionate dal database GenBank. L'analisi antigenica ha evidenziato la presenza di varie zone ad attività antigenica comuni alla maggior parte dei ceppi analizzati, indipendentemente dal genotipo e dalla specie di origine. Una differenza significativa è stata evidenziata nel ceppo 77/00 isolato da *Dicentrarchus labrax*; in questo ceppo manca un dominio legante gli MHC presente nelle altre sequenze analizzate appartenenti allo stesso genotipo. La mancanza di questo dominio è da attribuire ad una variazione della sequenza amminoacidica a livello dell'estremità amminica della proteina.

Una diversa espressione dei domini antigenici influenza la capacità del virus di interagire con il sistema immunitario dell'ospite; la mancata espressione di questi domini può, infatti, consentire al virus di eludere il sistema immunitario incrementando la propria virulenza. Queste osservazioni assumono maggiore rilievo in considerazione del ruolo fondamentale svolto da questa proteina.

## PATOLOGIA COMPARATA DELLE INFEZIONI MORBILLIVIRALI NEI MAMMIFERI ACQUATICI

G. Di Guardo\*, L. Della Salda\*, G. Marruchella\*, U. Agrimi\*\*, G. Terracciano\*\*\*, S. Kennedy\*\*\*\*

\**Dipartimento di Scienze Biomediche Comparate, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Teramo;*

\*\**Laboratorio di Medicina Veterinaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma;*

\*\*\**Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana, Pisa;*

\*\*\*\**Department of Agriculture and Rural Development for Northern Ireland, Veterinary Sciences Division, Stormont, Belfast, Irlanda del Nord*

A partire dal 1987, almeno 8 diverse epidemie morbillivirali hanno causato altrettanti episodi di mortalità collettiva nelle popolazioni di pinnipedi e di cetacei dell'intero Pianeta. I virus responsabili di tali epidemie, tutti appartenenti al genere *Morbillivirus* (Fam. *Paramyxoviridae*), sono stati ulteriormente caratterizzati dal punto di vista genomico ed antigenico grazie ad opportune indagini di tipo biomolecolare. È stato così possibile distinguerli in ceppi di virus del cimurro ("*Canine Distemper Virus*", CDV), in grado di infettare i pinnipedi, nonché in tre nuovi morbillivirus, mai segnalati prima, denominati rispettivamente "*Phocid (Phocine) Distemper Virus*" (PDV), "*Porpoise Morbillivirus*" (PMV) e "*Dolphin Morbillivirus*" (DVM), il primo in grado di infettare i pinnipedi, i rimanenti due i cetacei. Questi ultimi sono stati più recentemente riuniti nella comune definizione di "*Cetacean Morbillivirus*" (CMV).

I reperti anatomico-istopatologici più comunemente osservabili nel corso di tali infezioni consistono: a) in una polmonite bronco-interstiziale bilaterale non purulenta, caratterizzata a sua volta da iperplasia dei pneumociti di tipo II e dalla formazione di sincizi endobronchiali, endobronchiolari ed endoalveolari di tipo Warthin-Finkeldey; b) in un'encefalite multifocale non purulenta; c) in una grave e generalizzata deplezione dei tessuti linfo-reticolari dell'ospite. Inoltre, è di assai frequente riscontro la presenza di inclusioni virali eosinofile, intracitoplasmatiche ed intranucleari, rilevabili all'interno delle cellule dell'epitelio nasale, tracheale, bronchiale, bronchiolare ed alveolare (pneumociti di tipo II), nonché nei neuroni, negli astrociti e nelle cellule ependimali. Tali inclusioni, alla stessa stregua dei suddetti elementi cellulari e delle cellule linfoidi, risultano spesso positive alle indagini immunostochimiche volte a dimostrare la presenza di specifici antigeni virali.

Sebbene le infezioni morbillivirali dei mammiferi acquatici siano state oggetto di molteplici indagini nel corso degli ultimi 15 anni, numerosi risultano tuttora i quesiti insoliti e meritevoli di ulteriore attività di ricerca in tale ambito. In particolare, rimangono del tutto aperte le questioni relative all'origine di tali virus, al loro spettro d'ospite *in vivo* (quest'ultimo comprendente anche i mammiferi terrestri), alla loro patogenicità, ecologia ed epidemiologia. Rimane infine da chiarire l'eventuale effetto sinergizzante che certi contaminanti ambientali, quali in particolare gli organoclorurati (PCB, diossine, 4-4' DDE, ecc.) ed i metalli pesanti (Hg, Pb, Cd, ecc.), potrebbero esplicare nel modulare l'azione patogena e l'attività patogenetica dei morbillivirus nei mammiferi acquatici.

## LOCALIZZAZIONE INTRAOCULARE DI *FLAVOBACTERIUM PSYCHROPHILUM* IN TROTA IRIDEA (*O. MYKISS*)

D. Berton<sup>1</sup>, P. Beraldo<sup>1</sup>, M. Sarti<sup>2</sup>, M. Galeotti<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Università degli Studi di Udine, Facoltà di Medicina Veterinaria, Unità di Patologia e Ittiopatologia, Via delle Scienze, 206-Udine

<sup>2</sup>Skretting, Fraz. S. Zeno, 37060 Mozzecane (VR)

Le infezioni da *F. psychrophilum* in trota iridea si caratterizzano per differenti manifestazioni patogenetiche e cliniche in base all'età, a pregresse infezioni a eziologia virale o a fattori ambientali. La localizzazione cutanea di *F. psychrophilum* determina l'insorgenza di sindromi erosive ed ulcerative note come "Fin Rot Disease", "Saddleback Disease" e "Peduncle Disease". La forma setticemica di Flavobatteriosi (RTFS), che colpisce gli avannotti di trota iridea, si caratterizza per una abbondante moltiplicazione batterica a livello splenico, mentre, recentemente, sono state descritte localizzazioni oculari di *F. psychrophilum* associate a retinite ed uveite. Un ruolo importante di *F. psychrophilum* viene inoltre riconosciuto nella malattia branchiale della trota iridea. In questi ultimi anni, in diversi allevamenti di trota iridea localizzati nel nord-est Italia, sono stati segnalati episodi morbosi a carico di giovanili (5-20 g), caratterizzati da perdita dell'occhio e da tassi di mortalità fino al 15% della popolazione, probabilmente ascrivibili a *F. psychrophilum*. Scopo del presente lavoro è quello di descrivere da un punto di vista clinico, anatomopatologico ed istologico uno di questi episodi. In una trota coltura situata nel nord-est Italia, nella primavera 2002 si è osservato un episodio di mortalità a carico di giovanili di trota iridea aventi peso medio di 8-10 g. I soggetti interessati, allevati in raceways con pareti in cemento e fondo in ghiaia, ad una densità di 12-15kg/m<sup>3</sup>, con una temperatura dell'acqua di 12,5° C ed in buone condizioni igienico-sanitarie, presentavano una sintomatologia caratterizzata da esoftalmo con opacamento corneale e colorazione chiara della cute. Un numero significativo di soggetti in sintomatologia clinica è stato sottoposto a esame necroscopico ed agli esami batteriologici e parassitologici di routine. In aggiunta, alcuni campioni sono stati valutati tramite gli esami istologico e immunoistochimico. I soggetti campionati non presentavano lesioni anatomopatologiche significative e gli esami batteriologici e parassitologici di routine, hanno dato risultati non correlabili con la mortalità osservata. La colorazione di Gram ha messo in evidenza la presenza batteri filiformi Gram-, solamente nei preparati ottenuti da umor acqueo. L'esame istologico ha evidenziato una forte congestione di tutto il sistema nervoso centrale associata ad una infiltrazione infiammatoria delle meningi (meningite cronica) che attraverso il nervo ottico interessava anche la retina. L'occhio era interessato alternativamente da fenomeni di panoftalmite, uveite e distacco della retina con o senza ulcerazione corneale. Batteri filiformi, Gram-, probabilmente riconducibili a *Flavobacterium* sp., immersi in una matrice necrotica ad affinità eosinofila all'interno della camera oculare, sono stati evidenziati tramite la Gram secondo Twort. L'esame immunoistochimico ha confermato l'infezione da *F. psychrophilum*. I risultati ottenuti consentono di sospettare un'infezione da *F. psychrophilum* ogniqualevolta si osservino stati morbosi caratterizzati da lesioni oculari e perdita dell'occhio. Tale infezione, che appare avvenire per via ematogena, conferma l'elevata capacità di *F. psychrophilum* di manifestarsi con forme cliniche differenti tra loro. Il trattamento con ossitettraciclina (75 mg/kg/pv per 10 gg) non ha modificato né la mortalità in corso né la sintomatologia clinica.

## EPISODIO DI MORTALITA' CRONICA IN BRANZINI (*DICENTRARCHUS LABRAX*) CAUSATA DA *AEROMONAS SOBRIA*

A. Manfrin<sup>1</sup>, K. Qualtieri<sup>1</sup>, M. Vascellari<sup>1</sup>, M. Volpin<sup>1</sup>, L. Selli<sup>1</sup>, A. Novelli<sup>2</sup>, G. Bovo<sup>1</sup>

1) Istituto Zooprofilattico delle Venezie – Legnaro (PD)

2) Ittica Caldoli – Poggio Imperiale (FG)

Durante la stagione 2001-2002, in un allevamento intensivo di branzini (*Dicentrarchus labrax*), si è verificato un episodio di mortalità cronica, durato alcuni mesi, che ha comportato gravi perdite economiche per l'allevatore. I soggetti, tutti di taglia superiore ai 200 gr., erano allevati in gruppi da 25.000 in 12 vasche a terra da 300 m<sup>3</sup> ciascuna, alimentate con acqua di pozzo avente salinità pari al 3-4‰ e alla temperatura costante di 25° C ± 1° C.

All'esame clinico i branzini presentavano letargia, atassia locomotoria e difficoltà respiratoria e la mortalità era di 40-50 soggetti per vasca al giorno.

Da 16 soggetti sono stati effettuati l'esame anatomico-patologico, parassitologico, batteriologico, virologico su cellule SSN-1, BF-2 e EPC ed istologico.

All'esame autoptico tutti gli animali presentavano gravi lesioni emorragiche sulle pinne, sulla cute e negli organi interni e alcuni di essi dei focolai necrotico granulomatosi a carico di rene, fegato e milza.

L'esame virologico è risultato negativo mentre da fegato, rene e milza di tutti i soggetti è stato isolato in purezza *Aeromonas sobria*, patogeno di raro riscontro in episodi di mortalità delle specie ittiche.

Il ceppo è stato successivamente somministrato per via i.p., per bagno e per via branchiale a gruppi di 10 branzini stabulati presso l'acquario sperimentale dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, riproducendo in essi sia la sintomatologia clinica sia le lesioni istopatologiche riscontrate durante l'episodio di mortalità cronica in allevamento. Da tutti i soggetti, inoltre, è stato nuovamente isolato in purezza il ceppo di *A. sobria* utilizzato per l'infezione sperimentale.

In conclusione, è possibile affermare che anche ceppi scarsamente patogeni per i pesci, come è il caso di *Aeromonas sobria*, in particolari condizioni (alta densità degli animali, scarsa salinità, alimentazione spinta) sono in grado di originare episodi di malattia che, se interessano animali a fine ciclo produttivo, a lungo termine possono determinare gravi perdite economiche.

## **PRIMA DESCRIZIONE DI SETTICEMIA ENTERICA DA EDWARDSIELLA ICTALURI IN PESCE GATTO AMERICANO (*ICTALURUS PUNCTATUS*) IN ITALIA**

F. Marcer, D. Florio, A. Gustinelli, A. Manfrin\*, M.L. Fioravanti

*Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale, Università di Bologna  
\* Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro (PD)*

La setticemia enterica del pesce gatto, sostenuta da *Edwardsiella ictaluri*, è una delle più importanti cause di mortalità nel pesce gatto americano (*Ictalurus punctatus*) negli Stati Uniti. Nonostante *I. punctatus* sia considerata la specie più sensibile all'infezione, *E. ictaluri* è stata isolata da diverse altre specie ittiche dulciacquicole. La setticemia enterica del pesce gatto si manifesta generalmente in forma acuta a temperature dell'acqua comprese tra 20 e 30° C e viene considerata una patologia stagionale. Risulta ufficialmente segnalata, oltre che negli USA, anche in Thailandia e in Australia, e se ne sospetta la diffusione in tutte le aree geografiche in cui il pesce gatto americano è stato introdotto a scopo d'allevamento. Non risultano descritti a tutt'oggi casi di setticemia enterica negli ambienti produttivi italiani. Nel luglio 2003, nel corso di un episodio di grave mortalità verificatosi in un allevamento dell'Emilia Romagna in avannotti di pesce gatto americano (peso medio: 2 g) sono state condotte ricerche parassitologiche e batteriologiche su 50 soggetti. La sintomatologia consisteva in nuoto superficiale, letargia alternata a movimenti circolari improvvisi, presenza di emorragie nella zona orale e sui barbigli, caratterizzate da facile sanguinamento, addome dilatato. Gli esami parassitologici hanno evidenziato la presenza di rari ectoparassiti del genere *Trichodina* e *Ichthyobodo* e rari cestodi Proteocephalidae a livello intestinale. L'esame necroscopico evidenziava anemia branchiale con abbondante presenza di muco, ascite, aumento di volume del rene e, in alcuni soggetti, emorragie focali a livello dell'ultimo tratto dell'intestino. Dal cervello e dal rene di 30 soggetti sono stati condotti esami colturali per batteri utilizzando i seguenti terreni: Tryptic Soy Agar (TSA), Brain Heart Infusion Agar (BHIA) e Blood Agar (BA), successivamente incubati a 25° C±1 per 72 ore. In 48 ore si è osservata sui terreni BHIA e BA crescita quasi in purezza di *Edwardsiella ictaluri*. Le colonie in esame presentavano aspetto puntiforme, di colore grigio-biancastro a margini irregolari ed emolitiche su BA. All'esame microscopico i batteri si presentavano come bacilli Gram negativi, di 0,5-1,25 µm. L'identificazione ha previsto una serie di test preliminari che hanno permesso di definire questi microrganismi: ossidasi negativi, catalasi positivi, debolmente mobili su SIM a 25° C±1 ed immobili a 37° C ±1 e fermentanti. Sono state successivamente condotte le seguenti prove biochimiche in macrometodo a 25° C±1: prova di produzione di idrogeno solforato su Triple Sugar Iron Agar, prova di produzione dell'indolo, prova di utilizzazione del citrato e prova di crescita a 37°C±1. Tutti i test sono risultati negativi. E' stata inoltre effettuata un'identificazione biochimica utilizzando il sistema di identificazione API 20E (BioMerieux), ottenendo il seguente profilo numerico: 4004000, che secondo Hawke e coll. (1998), permette di identificare correttamente *E. ictaluri*. Il trattamento antibiotico, condotto sulla base dei risultati dell'antibiogramma con prodotti autorizzati, non ha consentito di fermare immediatamente la mortalità, che si è protratta per circa altre due settimane portando i valori complessivi intorno al 50% della popolazione presente in vasca. Questo episodio rappresenta il primo caso di setticemia enterica del pesce gatto americano descritto ufficialmente in Italia e conferma la diffusione di questa patologia nelle aree geografiche che hanno adottato l'allevamento di questa specie ittica.

## PATOLOGIE DI ORIGINE BATTERICA IN KILLI ALLEVATI IN ACQUARIO: PRIME OSSERVAZIONI

M. Prearo, E. Pavoletti, G. Amato<sup>1</sup>, L. Locatelli, D. Prearo, P. Arsieni, M.C. Abete, A. Solenne<sup>1</sup>

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

<sup>1</sup> *A.I.K. - Associazione Italiana Killifish – Torino*

L'acquariofilia, negli ultimi anni, presenta un trend fortemente positivo: il pesce ornamentale rappresenta l'animale da compagnia più frequente nelle nostre case. Tra i pesci d'acquario considerati "particolari", che riscuotono sempre più un maggior consenso, anche se restano ai più ancora del tutto sconosciuti, troviamo i killi. Con tale termine vengono comprese una serie di famiglie di pesci, in parte molto diverse tra di loro, con soggetti generalmente di piccola taglia ed ovipari; si conoscono oltre 650 specie inserite in tale categoria.

Erroneamente i killi sono considerati pesci stagionali, cioè che presentano un ciclo vitale relativamente breve; tale affermazione è vera in parte (solo per alcuni generi), in relazione alla tipologia del loro habitat naturale, costituito in buona parte da pozze o corsi d'acqua con presenza di diversi livelli idrici nel corso della stagione delle piogge o della stagione secca. La forma di resistenza in questi ambienti è data dall'uovo embrionato che si può mantenere vitale nello strato di torba del letto del bacino idrico prosciugato. In realtà, molti altri killi appartengono a generi, in cui la vita media è decisamente superiore all'anno; questi pesci hanno adottato un altro tipo di riproduzione, ricorrendo a uova adese generalmente a substrati vegetali.

Nel periodo compreso tra il settembre 2001 e l'agosto 2003 sono stati analizzati 69 killi appartenenti ai generi *Aphyosemion*, *Epiplatys*, *Nothobranchius*, *Pituna* e *Simpsonichthys* provenienti da acquari domestici e da piccoli allevamenti amatoriali. Ad ogni esemplare giunto in laboratorio, è stato effettuato un accurato esame anatomopatologico, parassitologico a fresco di branchie e cute ed un esame colturale, tramite semina su terreni di primo isolamento. Dopo un periodo d'incubazione di 24-48 ore a 22-25° C, le colonie batteriche eventualmente sviluppatesi, sono state sottoposte a colorazione di Gram ed identificate con il sistema API. Su tutti gli esemplari inoltre è stato eseguito un secondo esame colturale per la messa in evidenza di micobatteri, mediante prelievo degli organi interni, loro omogeneizzazione, successiva decontaminazione e semina su terreni specifici per germi acido-alcool resistenti.

All'esame anatomopatologico e parassitologico non sono stati rilevati quadri particolari, se si eccettua una diffusa presenza di Malattia Branchiale; l'esame colturale ha invece messo in evidenza germi Gram negativi appartenenti, in ordine di frequenza, ai generi *Aeromonas*, *Citrobacter* e *Vibrio*. Sono stati inoltre isolati alcuni ceppi di *Mycobacterium fortuitum* e *M. chelonae*. Comunque, circa un terzo dei soggetti esaminati (24 killi su 69 considerati, pari al 34,8%) non ha presentato quadri ed isolamenti riconducibili a malattie di origine batterica; la loro morte è quindi da ricondursi a cause di origine ambientale.

Quest'indagine, nonostante il numero ridotto di esemplari, dovuto alla difficoltà di reperire tali soggetti in commercio, vuole essere un primo contributo allo studio delle patologie di origine batterica in questo gruppo particolare di pesci ornamentali.

## TOLLERANZA ALLO SHOCK TERMICO DI CEPPI DI *LACTOCOCCUS GARVIEAE* ISOLATI DA TROTA IRIDEA (*ONCORHYNCHUS MYKISS*)

A. Manfrin<sup>1</sup>, M. Corrò<sup>1</sup>, F. Franceschini<sup>2</sup>, M. Volpin<sup>1</sup>, R. Perin<sup>1</sup>, S. Friso<sup>1</sup>, K. Qualtieri<sup>1</sup>

1) Istituto Zooprofilattico delle Venezie – Legnaro (PD)

2) AULSS n.9 Dipartimento Prevenzione - Servizi Veterinari - Treviso

La lattococcosi, provocata da *Lactococcus garvieae*, risulta essere da alcuni anni la principale patologia di natura batterica che colpisce la trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*), soprattutto nelle fasi di ingrasso. *L. garvieae* risulta particolarmente virulento ed è in grado di causare mortalità del 30-50 % in soggetti a fine ciclo produttivo, con gravi ripercussioni economiche per l'allevatore.

Una nostra precedente indagine ha messo in evidenza la presenza di *L. garvieae* (43% dei soggetti analizzati risultati positivi) in trote stabulate nelle vasche di pre-macellazione di alcuni stabilimenti per la lavorazione dei prodotti ittici situati nel Nord Est d'Italia.

Poiché alcune segnalazioni bibliografiche ipotizzano per il microrganismo un ruolo di potenziale patogeno per l'uomo, soprattutto per soggetti immunocompromessi, si è ritenuto opportuno sottoporre a shock termico 10 ceppi batterici isolati durante tale indagine dalla muscolatura di trote iridee destinate alla lavorazione (filettatura e affumicamento) e al consumo diretto per valutarne la capacità di resistenza alle temperature elevate.

Con tali ceppi batterici si sono preparate delle sospensioni a titolo noto ( $10^9$  U.F.C./ml) che sono state sottoposte a trattamento termico a 50° C, 60° C, 70° C e 80° C, per intervalli di tempo diversi: 5, 10, 20 e 30 minuti.

La semina in piastra delle sospensioni dopo il trattamento ha permesso di evidenziare i ceppi batterici ancora vitali e di selezionare quelli con più spiccati caratteri di resistenza.

Con quest'ultimi sono state preparate nuove sospensioni a diversa diluizione (da  $10^2$  a  $10^8$  U.F.C./ml) che sono state sottoposte a shock termico a 70° C e 75° C per 10, 20 e 30 minuti.

La prova sperimentale ha evidenziato che tutti i ceppi batterici risultano inattivati a 75° C e 80° C, mentre si è osservata crescita batterica, in percentuali variabili dal 37.5 al 100 % dopo lo shock termico effettuato a 50° C, 60° C e 70° C.

Questa particolare resistenza di *L. garvieae* alle alte temperature pone alcuni quesiti che andranno risolti con ulteriori indagini e sperimentazioni, in quanto sia il processo di affumicamento a freddo che quello a caldo, sia la cottura delle carni di trota, difficilmente comportano il raggiungimento "a core" di temperature superiori ai 70° C.

Fortunatamente non esistono segnalazioni di tossinfezioni alimentari legate al consumo di prodotti ittici contaminati da *L. garvieae*, ma la sua capacità di persistere nelle carni di tale specie ittica deve spingerci ad approfondire le ricerche sulla sua reale, seppur minima, potenzialità zoonosica.

Inoltre, da un punto di vista epidemiologico, potrebbe essere utile valutare se esiste la possibilità reale di diffusione dell'agente patogeno ad altri animali e nell'ambiente tramite il riutilizzo degli scarti di lavorazione dei prodotti ittici, con la necessità di dover adottare nuovi accorgimenti per il loro impiego.

## LE DIFESE DELL'OSPITE CONTRO L'INFEZIONE DA *LACTOCOCCUS GARVIEAE*: RUOLO DELLA FAGOCITOSI

L. Gusmani, E. Buonasera, D. Volpatti, D. Berton, M. Galeotti

*Dipartimento di Scienze della Produzione Animale, Unità di Patologia Generale e Ittiopatologia, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Udine, Via delle Scienze 208, 33100 Udine.*

Suscita attualmente grande interesse la possibilità di controllare la streptococcosi ittica provocata da *Lactococcus garvieae* mediante un vaccino che conferisca una protezione di lunga durata. Questo obiettivo è perseguibile anche attraverso il miglioramento delle conoscenze delle componenti batteriche dotate di maggiore immunogenicità, in grado di stimolare efficacemente la risposta immunitaria.

Fin dagli anni Ottanta sono stati individuati ceppi con differente grado di virulenza e di immunogenicità, che sono state messe in seguito in relazione alla presenza o meno di capsula. L'antigene capsulare sembrerebbe avere un'attività antifagocitaria mascherando gli antigeni corpuscolari sottostanti e rendendoli meno accessibili al riconoscimento da parte del sistema immunitario. D'altra parte l'importanza dell'opsonizzazione nella fagocitosi è stata dimostrata mediante esperimenti di immunizzazione passiva: la preincubazione dei batteri con antisiero conferisce protezione dall'infezione. La protezione non sembra dovuta all'attivazione della via classica del complemento, in quanto i ceppi virulenti sono resistenti all'uccisione da siero, come dimostrato da Barnes *et al.*, 2001. E' stato dimostrato che la presenza di anticorpi specifici nel siero inattivato al calore, in cui il sistema del complemento è inefficace, permette in un saggio di fagocitosi un'attività battericida da parte di macrofagi di trota pari al 50% (Barnes *et al.*, 2001, b).

In questa indagine sono state analizzate le molecole del batterio coinvolte nella protezione dall'infezione. Per questo scopo sono stati utilizzati sieri immuni prodotti in trota iridea o coniglio, che in immuno blotting evidenziano bande proteiche in parte differenti. Tali sieri sono stati confrontati anche in saggi di fagocitosi in presenza o assenza di complemento. L'esperimento condotto incubando i leucociti con cellule batteriche in assenza e presenza di siero immune, inattivato e non al calore, ha evidenziato che la maggiore attività di uccisione era presente quando le cellule batteriche erano state trattate con siero immune (75%) e siero non immune (47%). Quando i batteri erano stati trattati con siero inattivato l'attività si è ridotta al 24% per il siero immune e la 9% per quello non immune.

La tecnica immunoistochimica, con gli stessi sieri, permette di trarre indicazioni sull'immunogenicità degli antigeni di *L. garvieae* in ospiti diversi (trota iridea e coniglio). Particolarmente suggestiva è la rivelazione dei batteri mediante immunoistochimica su sezioni di organi prelevati da soggetti infetti, che risulta nettamente migliore all'interno dei fagociti, suggerendo un parziale smascheramento di antigeni batterici sottocapsulari nell'ambiente intracellulare.

## L'INFEZIONE DA *VAGOCOCCUS SALMONINARUM* DELLA TROTA IRIDEA IN ITALIA

C. Ghittino, F. Agnetti, C. Panzieri, S. Cabra<sup>1</sup>, S. Colussi<sup>1</sup>, M. Prearo<sup>1</sup>

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche - Perugia*

<sup>1</sup>*Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta - Torino*

Fra le malattie emergenti che colpiscono i salmonidi vanno annoverate le infezioni sostenute da cocchi Gram positivi patogeni a temperatura dell'acqua inferiore ai 12° C. La Vagococcosi, o infezione da *Vagococcus salmoninarum*, è la più frequente di queste, con una diffusione cosmopolita (Nord America, Australia ed Europa). Diversi focolai della malattia sono stati riscontrati anche in Italia a partire dagli anni '90. Colpisce elettivamente soggetti di taglia superiore ai 100 g e si manifesta con decorso cronico e perdite annue stimabili attorno al 20%.

Nel presente lavoro vengono descritti il quadro sintomatologico ed anatomopatologico rilevato negli allevamenti di trota iridea italiani, i metodi diagnostici utilizzati, nonché i risultati delle prove di infezione sperimentale condotte in laboratorio.

I sintomi riscontrati sono stati accentuato esoftalmo bilaterale, melanosi, letargia ed anoressia. I reperti anatomopatologici edema del connettivo oculare, cheratite, anemia branchiale ed epatica, lievi emorragie a carico di fegato, vescica natatoria e peritoneo, splenomegalia, pericardite, iperemia ed edema cerebrale. Istologicamente si è apprezzata una sierosite localizzata soprattutto a carico epicardico e meningeo, nonché panoftalmite.

La diagnosi della malattia è stata effettuata tramite esame batteriologico, mediante prelievo dall'occhio e/o dal cervello, semina su agar sangue ed incubazione a 22° C: in caso di positività, dopo 48 ore si è osservata crescita di colonie biancastre circondate da aloni di  $\alpha$ -emolisi. Solo raramente (10% dei casi) il germe è stato isolato con il prelievo renale. L'identificazione batterica è avvenuta mediante impiego di prove biochimiche (gallerie API 20 STREP, ZYM, 50 CH), oppure tramite PCR.

Un'indagine sierologica sui ceppi di *V. salmoninarum* isolati nel corso dell'ultimo decennio in Italia, unitamente a ceppi provenienti da Francia e Spagna, è stata effettuata utilizzando un antisiero policlonale ottenuto contro il ceppo di riferimento di laboratorio (ITP 4545/97, isolato da trota iridea a Macerata).

L'infezione sperimentale condotta in acquario ha evidenziato come per il raggiungimento della DL<sub>50</sub> sia necessario un periodo di tempo variabile tra i 30 ed i 40 giorni, dopo challenge per via endoperitoneale con concentrazioni di *V. salmoninarum* pari a 10<sup>9</sup> ufc/pesce. Questi risultati confermano il lungo periodo d'incubazione e l'andamento tipicamente cronico della malattia.

## NEFRITE BATTERICA. CASISTICA ED OSSERVAZIONI PRATICHE

R. Giavenni

*Chezzi SpA, Via Provinciale 310, 33030 Coseano (UD)*

La Nefrite Batterica (NB) è una patologia dei salmonidi da tempo nota ed ampiamente descritta. In Italia essa è scarsamente citata nella letteratura specializzata forse a causa e della mancanza di indagini epidemiologiche specifiche e di un'effettiva modesta incidenza del fenomeno.

Durante un arco di 13 anni di attività di assistenza sanitaria nell'ambito della trotilcoltura, sono stati effettuati interventi diagnostici "di campo" in 132 differenti realtà produttive nazionali, diffuse prevalentemente nell'area nord orientale.

Mediante indagini autoptiche macroscopiche, supportate, in caso di lesioni sospette, da indagini microscopiche su impronte d'organi colorate secondo Gram, sono stati "presuntivamente" diagnosticati 33 episodi di NB per complessivi 439 casi con interessamento di 8 specie ittiche e di 23 allevamenti. Tali eventi hanno riguardato, sotto il profilo geografico, Lombardia, Veneto, Trentino Alto Adige e Friuli Venezia Giulia.

Più volte s'è vista la necessità di intervenire con trattamenti terapeutici, sulla cui efficacia è tuttavia difficile esprimere un giudizio definitivo.

La diagnosi presuntiva di NB si è basata sul riscontro macroscopico di lesioni renali, di aspetto simil ascessuale, spesso contenenti materiale purulento. La presenza microscopica di diplobacilli Gram + su vetrini allestiti mediante impronte di organi e l'assenza di crescita batterica su TSA, erano poi ritenuti elementi sufficienti per l'emissione di diagnosi di NB, in accordo con quanto riportato in passato nel Fish Health Blue Book. Solo una parte delle indagini diagnostiche presuntive sono state avvallate da diagnosi ufficiali di conferma..

La NB è certamente presente nel nostro paese con una diffusione verosimilmente superiore rispetto ai casi qui riportati, che non costituiscono l'esito di una ricerca mirata e condotta sull'intero territorio nazionale, ma solo l'aspetto parziale e settoriale di un lavoro più vasto.

In un momento come quello che i trotilcoltori stanno attualmente vivendo, caratterizzato da una profonda difficoltà del mercato, sensibilmente aggravata dalla crisi idrica e da patologie ben più gravi e difficilmente controllabili, parlare di NB può sembrare un non senso. Questa malattia, che sembra caratterizzare soprattutto le "acque fredde", si manifesta, infatti, su soggetti di età prevalentemente superiore ad un anno, con mortalità ad andamento cronico, in forma di stitilicidio, e con un impatto economico non particolarmente rilevante. Tutto ciò probabilmente fa sì che, in taluni casi ove, ad esempio, patologie più serie siano concomitanti, la NB possa quasi passare inosservata.. Ciò nonostante, il fatto di aver riscontrato l'infezione, per il 49,2% dei casi osservati, in specie ittiche destinate esclusivamente al ripopolamento delle acque pubbliche (fario, marmorate, temoli e salmerini alpini), pone il problema di una sempre migliore attenzione sanitaria agli stocks da semina. Se da un lato, infatti, si persegue l'obiettivo di ripopolare solo con pesce indenne da malattie virali e proveniente da allevamenti riconosciuti, trascurando la NB si rischia di produrre un danno biologico poi difficilmente rimediabile. L'introduzione di novellame in acque pubbliche può avvenire in assenza di malattia conclamata. Se ipoteticamente qualche soggetto affetto da NB dovesse raggiungere la maturità sessuale, riproducendosi potrebbe trasmettere verticalmente l'infezione alla progenie. Ancora più gravi potrebbero risultare le conseguenze per le acque e per le popolazioni ittiche attualmente oggetto di speciale salvaguardia e protezione perché minacciate di estinzione (trota marmorata, temolo, ceppi di fario autoctona).

Sarebbero quantomeno auspicabili controlli preventivi ed ufficiali sulle popolazioni ittiche allevate a scopo di ripopolamento, facendo eventualmente ricorso alla immunofluorescenza indiretta, quale metodo rapido per la diagnosi della NB.

## ASPETTI SANITARI NELL'ALLEVAMENTO DELLA VONGOLA FILIPPINA (*TAPES PHILIPPINARUM*) NELLA REGIONE VENETO

G. Ceschia, S. Zanchetta, M. Cestaro, M. Zambon, M. Sello

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Area Ittiopatologia, Laboratorio Patologia Molluschi, via della Roggia 102, 33030 Basaldella di Campoformido (UD)*

L'allevamento della vongola filippina (*Tapes philippinarum*) ha avuto inizio nel 1983 nella Regione Veneto. Rappresenta una voce insostituibile nell'economia dell'area (nel 1999 la produzione regionale era di 51.000 t).

Scopo della ricerca, attuata in collaborazione con la Direzione Regionale per la Prevenzione, Servizio Igiene, Alimenti e Nutrizione, e le AULSS locali (Venezia, Chioggia ed Adria) è stato quello di individuare i principali agenti eziologici presenti nell'allevamento della vongola filippina del Veneto mediante un piano di monitoraggio sanitario programmato, alla luce di quanto previsto nei DPR 555/92 e 395/98.

Il monitoraggio sanitario negli anni 2000-2002 ha interessato tutte le aree di produzione della Regione Veneto. I campioni sono stati prelevati dalle AULSS Venete (Venezia, Chioggia, Adria) e recapitati all'Laboratorio Patologia Molluschi (UD). Sui campioni sono stati effettuati i seguenti esami: ricerca macroparassiti (stereomicroscopio); ricerca colturale per *Perkinsus* da branchie (semina in Tioglicolato medium modificato, incubazione per 5-7 giorni a temperatura ambiente al buio, colorazione con soluzione di Lugol, lettura al microscopio ottico); ricerca istologico per parassiti (fissazione in Carson, inclusione in paraffina, taglio, colorazione Ematossilina-Eosina, lettura al microscopio ottico).

Il monitoraggio effettuato ha evidenziato uno stato sanitario complessivamente soddisfacente; solamente la Perkinsiosi, in taluni campioni riscontrata con un grado di infestazione elevato, potrebbe rappresentare un rischio per la produzione. L'esame istologico, a partire dall'estate 2001, ha evidenziato alterazioni delle gonadi, degradazione e disorganizzazione tissutale. Questo potrebbe essere attribuito a negative condizioni ambientali (inquinamento), come pure effetto del *Perkinsus*.

L'inserimento del *Perkinsus atlanticus* tra gli agenti patogeni oggetto di denuncia obbligatoria alla CEE e all'OIE suggerisce la necessità di effettuare un monitoraggio sanitario continuo e programmato sulle aree di produzione e raccolta. Controllo da estendere alle introduzioni (molluschi vivi, uova e gameti) da Paesi terzi destinate alla reimmissione.

## **PRESENZA DI *MARTEILIA* SPP. IN MITILI (*MYTILUS GALLOPROVINCIALIS*) D'ALLEVAMENTO NELLE ACQUE LITORANEE DELLA LIGURIA ORIENTALE**

C. Ercolini<sup>1</sup>, S. Risso, B. Campo Dall'Orto, A. Terarolli<sup>1</sup>, D. Marchis, G. Ceschia<sup>2</sup>, M. Prearo

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, U.O. Sezione di Torino, Ittiopatologia e Acquacoltura*

<sup>1</sup> *Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Sezione di La Spezia*

<sup>2</sup> *Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie - Centro di Referenza Nazionale per le Malattie dei Molluschi bivalvi, Basaldella di Campofornido (UD)*

La Marteiliosi è una malattia sostenuta da un protozoo del genere *Marteilia* che colpisce numerose specie di molluschi bivalvi. Ne sono state descritte varie specie tra cui: *M. refrigens*, causa di gravi epizoozie nell'ostrica piatta (*Ostrea edulis*); *M. sydneyi* di notevole importanza nell'ostrica australiana *Crassostrea echinata* e *C. glomerata*; *M. maurini* parassita dei mitili *M. edulis* e *M. galloprovincialis*.

Il ciclo biologico del protozoo non è ancora stato del tutto chiarito, ma si sospetta la presenza di un ospite intermedio che ne permetta il completamento. Lo sviluppo del parassita, da cellula primaria fino alla liberazione delle spore, avviene nelle cellule dell'epitelio ciliato dello stomaco e della ghiandola digestiva dell'ospite.

Nel periodo compreso tra Giugno 2002 ed Agosto 2003 sono stati esaminati 892 campioni di *Mytilus galloprovincialis* presso il laboratorio della Sezione di La Spezia dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte Liguria e Valle d'Aosta. I molluschi provengono dalle mitilocolture spezzine delle zone di Porto Venere, Palmaria e della Diga centrale. Durante il primo anno di campionatura (secondo semestre 2002), sono stati analizzati 470 mitili, mentre nel 2003, sono stati campionati 422 mitili. Tutti i campioni sono stati sottoposti ad esame citologico, mediante impronta di parte della ghiandola digestiva su vetrino e colorazione con Hemacolor®. Successivamente i campioni sono stati inviati presso il laboratorio di Ittiopatologia di Torino per l'esame istologico, previa fissazione in formalina tamponata al 10%. Le sezioni ottenute sono state colorate con Ematossilina-Eosina, Hemacolor® e con la colorazione Tricromia di Masson.

L'osservazione di preparati per impronta, mediante microscopio ottico ad immersione, ha permesso di osservare nei mitili colpiti, le cellule protozoarie a diverso livello di maturazione.

L'indagine istologica ha confermato la presenza di *Marteilia* nelle partite colpite. Durante il primo anno di campionamento, sono stati riscontrati 13 mitili positivi per *Marteilia*, con una prevalenza pari al 2,77%, mentre nel 2003 la positività è risultata superiore, con 33 mitili, pari ad una prevalenza del 7,82%. Nel biennio 2002-2003, nella zona del Golfo di La Spezia quindi, si è osservata una percentuale di positività pari al 5,16%.

In questo biennio, nella zona monitorata dal presente studio, è stato osservato un solo caso di mortalità anomala (agosto 2003) dovuta a fattori ambientali.

La percentuale finora riscontrata, risulta essere relativamente alta rispetto ad altre zone d'allevamento italiane. Dai dati acquisiti non si ritiene attualmente che *Marteilia* sia limitante l'attività della mitilocoltura locale.

## **GIARDIA SPP. E CRYPTOSPORIDIUM SPP. NELLE VONGOLE (CHAMELEA GALLINA) DELLA COSTA ABRUZZESE**

U. Molini<sup>1</sup>, R. Iorio<sup>1</sup>, D. Traversa<sup>1</sup>, D. Nardinocchi<sup>1</sup>, C. Giansante<sup>2</sup>, A. Giangaspero<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Dipartimento di Scienze Biomediche Comparete, Università degli Studi di Teramo*

<sup>2</sup> *IZS dell'Abruzzo e del Molise, Reparto di Biologia Marina e Fluviale, Teramo*

La capacità dei molluschi bivalvi di filtrare elevati volumi di acqua, rende tali organismi in grado di concentrare un numero elevato di agenti patogeni per l'uomo e per gli animali. *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. sono tra i più comuni protozoi parassiti dell'intestino dell'uomo e degli animali; trasmessi per via oro-fecale ed attraverso il consumo di cibo o acqua contaminata, sono causa di diarrea grave in particolare nei soggetti giovani e/o immunocompromessi. Il presente lavoro ha inteso valutare, mediante indagini classiche e biomolecolari, la presenza di *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. nelle vongole (*Chamelea gallina*) della costa abruzzese. Nel mese di Marzo 2003, sono state raccolti 480 esemplari di vongole (*Chamelea gallina*) presenti in natura ad una distanza di circa 500 metri dalle foci dei fiumi Tronto, Vibrata, Tordino e Vomano. Da ciascun bivalve (120 per foce), precedentemente identificato, misurato e pesato (peso vivo), sono stati prelevati l'emolinfa (approssimativamente 100 µl/vongola) e la polpa. I campioni, divisi in pools, sono stati sottoposti al test di immunofluorescenza diretta (IFA) (MERIFLUOR *Cryptosporidium/ Giardia*; Meridian Diagnostic) e le cisti di *Giardia* e le oocisti di *Cryptosporidium* sono state contate. A causa di una possibile cross-reattività con altri microrganismi, i campioni di emolinfa sono stati anche testati con una PCR specifica per il gene COWP di *Cryptosporidium*. Oocisti di *Cryptosporidium* sono state rilevate in tutti i campioni di vongole con una concentrazione media compresa tra 8 e 45 oocisti/g nella polpa e tra 18 e 187 oocisti/ml nell'emolinfa. La presenza di questo protozoo è stata confermata con le indagini biomolecolari nelle vongole provenienti dai fiumi Vomano e Vibrata. Le cisti di *Giardia* sono state evidenziate esclusivamente nell'emolinfa dei campioni provenienti dalla foce del fiume Tordino con valori medi pari a 19 cisti/ml e il loro rilievo all'IFA è stato confermato microscopicamente. L'osservazione di *Giardia* spp. e di *Cryptosporidium* spp. nelle vongole della costa abruzzese, rappresenta la prima segnalazione nel territorio italiano di protozoi parassiti di interesse umano e veterinario; tale segnalazione assume un interesse sanitario notevole se si considera che le vongole, in alcuni casi, vengono consumate crude prima di essere sottoposte a depurazione. La caratterizzazione genotipica dei singoli isolati di entrambi i protozoi, attualmente in corso, oltre a definire l'identità, consentirà di stabilire l'ospite di provenienza e di conseguenza chiarire il reale rischio zoonosico nel territorio considerato. Il rilievo di *Giardia* spp. e di *Cryptosporidium* spp., nei molluschi acquatici, oltre all'interesse sanitario che riveste, consentirebbe di assegnare loro, soprattutto se confermato nel tempo, un ruolo come indicatori dell'inquinamento delle acque costiere abruzzesi.

### Bibliografia

Graczyk T.K., Thompson R.C.A., Fayer R., Adams P., Morgan U.M., Lewis E.J. (1999) - *Giardia duodenalis* cysts of genotype a recovered from clams in the Chesapeake Bay subestuary, Rhode River. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 61(4): 526-529.

Graczyk T.K., Marcogliese D.J., De Lafontaine Y., Da Silva J., Mhangami-Ruwende B., Pieniazek N.J. (2001) – *Cryptosporidium parvum* oocysts in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*): evidence from the St. Lawrence River. *Parassitol Res* 87: 231-234.

Thompson R.C.A., Hopkins R.M., and Homan W.L. (2000) - Nomenclature and genetic groupings of *Giardia* infecting mammals. *Parasitol Today* 16:210-213.

## LA PURIFICAZIONE DI HEAT SHOCK PROTEIN A 70 KDA (HSP70) DA *MYTILUS GALLOPROVINCIALIS* CONSENTE LO SVILUPPO DI SISTEMI DIAGNOSTICI ALTAMENTE SPECIFICI

E. Dainese, C. Angelucci, F. Mosca, V. Narcisi, F. Marsilio, V. Piro, I. Cozzani, P.G. Tiscar

*Dipartimento di Scienze Biomediche Comparete, Università degli Studi di Teramo, P.zza A. Moro 45, 64100 TERAMO*

La funzione delle proteine negli organismi viventi dipende dal mantenimento della loro peculiare struttura tridimensionale. Tale conformazione deriva principalmente dalle interazioni che intercorrono tra la proteina ed il solvente acquoso. Durante la biosintesi delle proteine, nella loro traslocazione a compartimenti interni o in presenza di agenti chimico-fisici stressanti (di origine biotica o abiotica), tali interazioni vengono fortemente alterate comportando, in particolare in proteine ricche di residui idrofobici, la perdita della conformazione nativa. Per evitare che ciò avvenga, tutti gli organismi viventi, dai batteri all'uomo sintetizzano una famiglia di proteine altamente conservate, le Heat Shock Proteins (HSPs), che legandosi a residui idrofobici e idrolizzando ATP, forniscono un microambiente idoneo al corretto ripiegamento delle proteine. In tal modo, le HSPs possono consentire anche l'adattamento o la resistenza degli organismi viventi a diverse condizioni ambientali e vengono quindi distinte rispettivamente in isoforme costitutive o inducibili.

In un animale concentratore e sessile, come il *Mytilus galloprovincialis*, la possibilità di monitorare l'espressione differenziale di tali isoforme consente di avere un valido marcatore biologico sia dello stato di salute dell'animale, sia della presenza di eventuali inquinanti ambientali.

In questa comunicazione viene riportata per la prima volta la separazione e caratterizzazione di due isoforme di HSPs, a 72 kDa e a 78 kDa, dal mantello di *Mytilus galloprovincialis* e la purificazione all'omogeneità dell'isoforma a più basso peso molecolare. A tale scopo l'estratto grezzo di mantello di *M. galloprovincialis*, previa centrifugazione a 260.000 g, è stato eluito in una colonna a scambio anionico (Source 15Q, Pharmacia) precedentemente equilibrata in tampone Tris/HCl 100 mM pH 8.0 in presenza di 5 mM EDTA e 0.5 mM PMSF, usando un sistema Fast Protein Liquid Chromatography (mod. AKTA Explorer, Pharmacia). La messa a punto di una cromatografia con un gradiente di NaCl ad intervalli discreti, ha consentito la separazione delle due isoforme a diverso peso molecolare. Entrambe le frazioni sono state successivamente applicate ad una colonna per cromatografia di affinità su resina di tipo ATP-agarosio (Sigma) ottenendo la purificazione all'omogeneità della frazione contenente l'isoforma a 72 kDa.

L'isolamento della proteina consente l'analisi della sua struttura primaria che, oltre a fornire la possibilità di effettuare analisi comparative con le sequenze di altre HSP note, permette il disegno di opportune sonde oligonucleotidiche e lo sviluppo di anticorpi monoclonali per la messa a punto di sistemi diagnostici altamente sensibili per il monitoraggio dell'espressione di HSP 70 in *M. galloprovincialis* in diverse condizioni sperimentali. Infine, questo lavoro permetterà di studiare più nei dettagli il ruolo di questa proteina quale parametro di benessere del mollusco, inteso sia come alimento da commercializzare vivo che come organismo vivente esposto nel proprio ecosistema a fattori di stress naturali o antropici.

## **CIRCOLARITÀ EMOCITARIA ED ESPRESSIONE MANTELLARE DI HEAT SHOCK PROTEIN A 70 KDA (HSP70) QUALI POSSIBILI INDICATORI DI STRESS IN *MYTILUS GALLOPROVINCIALIS***

F. Mosca, L. Spadaccini, V. Narcisi, P.G. Tiscar

*Dipartimento di Scienze Biomediche Compare, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Teramo, Piazza A. Moro 45, 64100 Teramo*

Lo stress rappresenta una perturbazione dell'omeostasi provocata da fattori fisici, chimici, biologici e fisiologici. Tra i fattori fisici, le variazioni termiche rappresentano le principali fonti di stress: scopo della presente sperimentazione è stato quello di sottoporre a fattori di stress, quali calore e refrigerazione, gruppi diversi di mitili (*Mytilus galloprovincialis*) al fine di testare l'applicabilità di due parametri capaci di indicare lo stato di sofferenza dei soggetti, quali l'aumento di circolarità (C) degli emociti e l'espressione di proteine dello shock termico a 70 KDa (HSP 70) nel mantello. A tal fine, si è per la prima volta utilizzato, in studi applicati ad animali acquatici, un lettore automatico di vitalità cellulare in grado, attraverso un analizzatore di immagini, di stimare contemporaneamente la concentrazione, la vitalità, e parametri morfologici degli emociti, quali diametro e circolarità. Nei confronti delle metodiche classiche, riferite alle varie tipologie di letture mediante microscopia ottica, l'utilizzo di tale apparecchiatura può rappresentare una tecnica più precisa e soprattutto rapida poiché esclusivamente strumentale, oltre che più realistica in quanto si studiano cellule in sospensione e non adese. Essa, infine, risulta più standardizzabile in termini tecnici, di interpretazione e confronto dei dati. La sperimentazione è stata eseguita su gruppi di mitili posti in stabulazione in acquari a 18° C, successivamente collocati per vari tempi a 40° C, ed infine ricollocati nelle condizioni originarie. Complessivamente sono state stimate oltre 10.000 cellule. Il trattamento termico ha determinato un aumento di C a carico degli emociti più piccoli di uguale intensità nei differenti gruppi di mitili, ma differente come cinetiche di ripristino delle condizioni omeostatiche quando riposti a 18° C. Comunque, a partire dalle 12 ore post trattamento, gli emociti di tutti i gruppi di mitili ritornavano ai valori di controllo. Anche gli effetti della refrigerazione, monitorati per 48 ore successive, hanno indotto un incremento del valore di C, sebbene in maniera più lenta. L'aumento di C, quindi, potrebbe costituire, in condizioni di stress, un parametro morfologico precoce. Per quanto riguarda la valutazione dell'HSP 70 nei soggetti stressati per un tempo più breve, l'espressione di questa proteina avveniva successivamente all'aumento di C, mentre negli organismi esposti al calore per tempi maggiori, l'induzione di HSP 70 aumentava parallelamente all'incremento di C, per poi proseguire con la medesima intensità fino alle 24 ore, a testimonianza di un segnale di risposta allo stress più ritardato nel tempo. Al contrario, la refrigerazione ha determinato una riduzione nell'espressione di HSP 70 in maniera proporzionale alla durata dell'esposizione. In conclusione, la circolarità emocitaria e l'espressione di HSP 70 possono costituire due importanti parametri di stress, morfologico e biochimico, precoce e tardivo, rispettivamente, da utilizzarsi in possibili monitoraggi inerenti la qualità ambientale, la qualità dei molluschi in termini di prodotto alimentare o, infine, riferiti più generalmente al benessere animale.

## **STUDIO COMPARATO MEDIANTE CITOMETRIA A FLUSSO, MICROSCOPIA CONFOCALE E FLUORIMETRIA IN MICROMETODO DELLA FAGOCITOSI IN EMOCITI DI *MYTILUS GALLOPROVINCIALIS***

F. Mosca, L. Gioia, V. Narcisi, P.G. Tiscar

*Dipartimento di Scienze Biomediche Comparate, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Teramo, Piazza A. Moro 45, 64100 Teramo*

L'impiego congiunto di moderne tecnologie, quali la citometria a flusso, la microscopia confocale, e la fluorimetria in micrometodo è stato rivolto, per la prima volta, allo studio dei processi difensivi e della relativa componente cellulare nell'ambito degli invertebrati marini. Campioni di emolinfa di mitili (*Mytilus galloprovincialis*) sono stati caratterizzati in citometria a flusso individuando tre distinte popolazioni emocitarie in funzione del loro diametro e della loro complessità strutturale, riferibile fondamentalmente alla granulosità. Successivamente sono state effettuate prove di fagocitosi utilizzando lieviti (Zyosan A) come stimolo e monitorando la produzione di radicali liberi dell'ossigeno (ROS) mediante il tracciante fluorescente 1,2,3 diidrorodamina. I risultati ottenuti hanno evidenziato come la popolazione emocitaria più grande, granulosa e numerosa, mostrava il maggior incremento di fluorescenza rispetto alle altre due popolazioni. Il medesimo protocollo utilizzato in citometria a flusso è stato applicato in micrometodo mediante fluorimetro, confermando l'aumento di fluorescenza, rispetto al controllo, durante l'esposizione allo stimolo fagocitario. Inoltre, la specificità della reazione nei confronti della produzione di ROS, è stata confermata mediante utilizzo di superossido dismutasi (SOD) ed inibitori dell'ossido nitrico sintetasi (L-NMMA). Gli studi in microscopia confocale, invece, hanno permesso di seguire nel tempo l'intero processo fagocitario distinguendone le differenti fasi, ovvero la produzione di ROS all'interno dei lisosomi, la formazione del fagosoma, la fusione fago-lisosomiale e, infine, la risoluzione del processo. Gli studi effettuati su emolinfa di mitili confermano, quindi, la presenza di diverse popolazioni emocitarie ed il ruolo fagocitario svolto da queste cellule in funzione delle loro dimensioni e della loro granulosità. In particolare, l'utilizzo della citometria a flusso è risultato idoneo nella valutazione della morfologia degli emociti e nella quantificazione dei loro processi fagocitari, sia nella popolazione totale che nelle distinte sottopopolazioni. Anche la valutazione fluorimetrica in micrometodo è risultata in grado di quantificare l'evento fagocitario, anche se tale metodica non permette di differenziare morfologicamente le diverse classi emocitarie e di studiarne singolarmente le proprietà biologiche. Tuttavia, la fluorimetria in micrometodo risulta maggiormente indicata quando si desidera analizzare contemporaneamente più campioni, oppure quando si desidera ottenere, in maniera esclusivamente strumentale, andamenti temporali del processo studiato. L'impiego della microscopia confocale, invece, trova maggiore applicabilità nella valutazione qualitativa della fagocitosi, in quanto ne descrive microscopicamente le diverse fasi. In conclusione, le diverse tecnologie impiegate possono costituire metodiche innovative negli studi del sistema difensivo degli invertebrati marini, finalizzate sia a ricerche di base che applicative.

## ECOPATOLOGIA DELLE ECTOPARASSITOSI NELLA FAUNA ITTICA DULCIACQUICOLA

C. Ghittino, S. Colussi<sup>1</sup>, M. Angelillo<sup>1</sup>, F. Agnetti, L. Lauro, M.C. Abete<sup>1</sup>, M. Prearo<sup>1</sup>

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche – Perugia*

<sup>1</sup> *Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta – Torino*

Nel presente lavoro vengono riportati i risultati di un'indagine, svolta nel corso del triennio 2001-2003, avente lo scopo di valutare la relazione esistente tra il variare delle condizioni ambientali nei bacini dulciacquicoli e la comparsa di ectoparassitosi nella fauna ittica. Lo sviluppo e il decorso di numerose parassitosi cutaneo-branchiali può infatti essere influenzato da diversi fattori ambientali propri dell'ecosistema acquatico. Tra questi primeggiano alcuni fattori fisici (temperatura, ore luce) e chimici (ossigenazione, pH, carica organica) delle acque, ma a volte possono essere coinvolti anche fattori biologici, quali fioriture algali e proliferazioni di piante acquatiche. Gli agenti implicati nel determinismo di queste patologie appartengono a tre principali gruppi tassonomici di ectoparassiti, vale a dire protozoi (ciliati e flagellati), vermi monogenei (dattilogiri e girodattili) e crostacei (copepodi e branchiuri).

Il termo-fotoperiodismo svolge da solo il ruolo più importante nell'insorgenza delle parassitosi esterne dei pesci. La loro comparsa è risultata quasi sempre favorita dalle elevate temperature delle acque (25-30° C) e dalla lunga irradiazione solare, condizioni che in Italia si verificano nel corso della stagione estiva. Nei pesci di stagno sono state rilevate di frequente protozosi quali Ittiofitiriasi, Tricodiniasi, Ictiobodiasi, oppure verminosi quali Dattilogirosi ed alcune Girodattilosì, patologie che hanno determinato tutte gravi quadri di Malattia Branchiale.

Anche l'eutrofizzazione è apparsa giocare un ruolo chiave nell'aggravare numerose ectoparassitosi: l'elevata temperatura e l'alta concentrazione di fosforo e composti azotati nelle acque, possono infatti causare abbondanti fioriture algali, che, determinando una riduzione dell'ossigenazione notturna, inducono stress nei pesci e conseguente predisposizione a crostaceosi quali Ergasilosi, Lerneosi e Argulosi. L'abnorme proliferazione di piante acquatiche può infine facilitare la trasmissione ai pesci degli anellidi irudinei (sanguisughe).

Da quanto riportato si deduce come la tutela dell'ecosistema acquatico sia importante per prevenire il diffondersi delle ectoparassitosi ed assicurare un adeguato benessere alla fauna ittica autoctona.

## AMPLIAMENTO DELL' *HOST-RANGE* DI MONOGENEI MICROCOTILIDI PARASSITI DI SPARIDI IN ALLEVAMENTO

D. Di Cave<sup>1</sup>, F. Cardia<sup>1</sup>, F. Athanassopoulou<sup>2</sup>, F. Vagianou<sup>2</sup>, F. Berrilli<sup>1</sup>, P. Orecchia<sup>1</sup>

1) Università di Roma "Tor Vergata", Dipartimento di Sanità Pubblica e Biologia Cellulare, Via Montpellier, 1, 00133, Roma, Italia

2) University of Thessaly, Faculty of Veterinary Medicine, Laboratory of Ichthyology & Fish Diseases, 224 Trikalon str, 43100 Karditsa, Greece.

Nell'ambito di ricerche sugli aspetti parassitologici e sulle patologie parassitarie correlati all'allevamento di specie ittiche innovative per l'acquacoltura mediterranea sono state osservate infestazioni da monogeni microcotilidi ritenuti non specifici per l'ospite esaminato.

a) Su *Diplodus puntazzo* e *Sparus aurata* allevati in gabbia nel Tirreno centrale è stato evidenziato il trasferimento di *Sparicotyle chrisophrii* da *S. aurata* (suo ospite specifico) a *D. puntazzo*, mai risultato infestato in natura. Tale passaggio è stato evidenziato non solo in policoltura ma anche in esemplari allevati in monocoltura in gabbie confinanti.

b) E' stata riscontrata in Grecia una mortalità di saraghi pizzuti allevati in gabbia. Gli esemplari esaminati sono risultati parassitati da tre diversi monogeni appartenenti all'ordine Polyopisthocotylea: *Atrispinum salpae* (Parona & Perugia, 1890), *A. seminalis* (Euzet & Maillard, 1973) e *Sparicotyle chrisophrii* (Van Benden & Hesse, 1863). Di queste specie solo *A. salpae* è ritenuto un parassita naturale del sarago pizzuto. Pertanto la specie *A. seminalis*, descritta e riscontrata sempre solo su *Diplodus annularis*, *D. sargus* e *D. vulgaris*, viene qui segnalata per la prima volta su *D. puntazzo* in allevamento. Il reperimento di questi parassiti sul sarago pizzuto allevato rappresenta un'ulteriore conferma dell'ampliamento dell'*host-range* di un parassita in particolari condizioni di confinamento artificiale e solleva il problema del pericolo che questo tipo di trasferimento può rappresentare.

c) Sulle branchie di *S. aurata* allevate in un impianto di maricoltura *off-shore* nel sud Tirreno è stato rinvenuto un parassita identificato come *Polylabris tubicirrus* (Paperna & Kohn, 1964) Mamaev & Parukhin 1976. Questo monogeneo non è mai stato osservato in natura sulle orate essendo stato descritto come parassita dei saraghi. La presenza di *P. tubicirrus* in *S. aurata* rappresenta una conferma alla prima segnalazione di questo parassita patogeno su orate in allevamento fatta da Silan *et al.* (1985).

I risultati della ricerca evidenziano parassiti e parassitosi emergenti nelle nuove specie allevate e il rischio correlato alla possibilità di scambio di infezioni parassitarie fra pesci allevati in gabbia e pesci selvatici. Il trasferimento di un parassita in un ospite non idoneo aumenta il rischio di danni per i pesci allevati e richiede nuove strategie di intervento. Si sottolinea pertanto la necessità di un monitoraggio parassitologico programmato sugli ospiti in allevamento.

## TREMATODI DIGENEI DI *MULLUS SURMULETUS* (L., 1758) DEL GOLFO DI CAGLIARI, SARDEGNA MERIDIONALE

V. Figus, J. Culurgioni, M. Cortis, V. D'Amico, G. Canestri Trotti\*

*Dip. Biologia Animale ed Ecologia - Università di Cagliari - Viale Poetto 1, Cagliari - vfigus@vaxca1.unica.it*

*\* Dip. Biologia Animale e dell'Uomo - Università di Torino. Via Accademia Albertina 17, Torino - giorgio.canestri@unito.it*

La triglia di scoglio, *Mullus surmuletus* (Pisces, Mullidae), è una rilevante risorsa alimentare attivamente pescata in tutto il bacino del Mediterraneo e le sue comunità elmintiche intestinali sono state studiate in diverse zone del Mar Mediterraneo. A quanto ci consta, non si hanno invece informazioni, relativamente alle acque meridionali della Sardegna, dove nel Golfo di Cagliari abbiamo cominciato a studiarne i Digenei parassiti esaminando, dal Gennaio al Giugno 2003, un campione di 56 esemplari di taglia commerciale (11-20 cm) e definendo prevalenza % e suoi limiti fiduciali, intensità media ed errore standard, abbondanza ed errore standard. Il 25% delle triglie sono risultate parassitate ed in ordine di frequenza il riscontro più comune è stato quello di Hemiuridae, specie plurime, (12,5%) seguito da *Opecoeloides furcatus* (10,7%), *Poracanthium furcatum* (7,1%), *Prosorhynchus crucibulum* (7,1%), *Aponurus laguncula* (5,4%), *Lasiotocus mulli* (3,6%), *Stephanostomum* sp. (1,8%); infestazioni plurime sono state riscontrate nel 14,3% dei soggetti esaminati.

## **MIXOSPORIDIOSI SISTEMICA IN TAPIR FISH (*GNATHONEMUS PETERSII*) IMPORTATI A SCOPO ORNAMENTALE**

M. Caffara, V. De Vita\*, A. Gustinelli, F. Quaglio\*\*, M.L. Fioravanti

*Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale, Università di Bologna*

*\*Acquario di Bologna, Ozzano Emilia (BO)*

*\*\* Dipartimento di Scienze degli Alimenti, Università di Bologna*

Le malattie parassitarie sostenute da Myxozoa vengono considerate un problema sanitario grave ed emergente negli ambienti d'acquacoltura. Meno numerose risultano essere le osservazioni relative a casi di Mixosporidiosi in pesci ornamentali. Viene qui descritto un grave episodio di Mixosporidiosi sistemica osservato in una partita di tapir fish (*Gnathonemus petersii*) proveniente dalla Nigeria. La partita risultava costituita da 800 soggetti di dimensioni di circa 13 cm. I segni clinici più evidenti consistevano in anoressia, letargia, dimagrimento progressivo fino a cachessia e morte. Tutti i soggetti sono stati mantenuti in osservazione per circa 60 giorni, nell'arco dei quali si è osservata una mortalità cumulativa del 50%. L'esame necroscopico dei soggetti che presentavano sintomatologia metteva in evidenza la pressoché totale scomparsa di grasso periviscerale e l'estremo assottigliamento della parete intestinale. L'esame parassitologico a fresco permetteva di osservare la presenza di spore di Myxozoa in diversi distretti dell'organismo, con particolare abbondanza a livello dello spessore della parete intestinale e della cistifellea. Le spore presentavano corpo di forma ovale ( $10 \times 7 \mu\text{m}$ ) ed erano dotate di un prolungamento caudale di circa  $8-10 \mu\text{m}$ . Le due capsule polari apparivano di forma allungata ( $6-7 \times 2-3 \mu\text{m}$ ) e contenevano ciascuna un filamento polare avvolto con 6 giri di spira. In base alle caratteristiche morfologiche delle spore i mixosporidi riscontrati venivano identificati come appartenenti al genere *Unicauda*, famiglia Myxobolidae, ordine Bivalvulida. Nelle branchie, oltre ad un esiguo numero di spore di *Unicauda* sp., venivano evidenziati plasmodi di *Henneguya* sp. nelle lamelle e nell'arco. All'esame istologico si osservavano spore di *Unicauda* sp. raggruppate in piccoli plasmodi nella sottomucosa dell'intestino e nella parete e nel lume dei vasi intestinali, senza evidenti reazioni flogistiche. Nelle branchie l'infezione da *Henneguya* sp. era di tipo intralamellare "a larghe cisti". Alcuni plasmodi si rinvenivano nel tessuto epiteliale dell'arco branchiale a ridosso del connettivo. L'assenza di presidi terapeutici efficaci nei confronti dei parassiti mixosporidi non ha permesso di intervenire con alcun trattamento. Questo episodio morboso sottolinea come la continua introduzione di specie ittiche esotiche a scopo ricreativo possa rappresentare, in assenza di idonei controlli sanitari, una possibile via d'entrata di agenti parassitari potenzialmente patogeni per la fauna ittica nazionale.

## COINFEZIONE ENTERICA DA MICROSPORIDI E MIXOSPORIDI IN SPIGOLE (*DICENTRARCHUS LABRAX*) D'ALLEVAMENTO.

M.L. Fioravanti, F. Marcer, M. Caffara, F. Rogato\*, F. Quaglio\*\*

*Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale, Università di Bologna*

*\*Skretting Italia, Mozzecane (VR)*

*\*\*Dipartimento di Scienze degli Alimenti, Università di Bologna*

Negli ambienti produttivi di acquacoltura le malattie parassitarie sono considerate in generale un rischio sanitario di minore importanza rispetto alle patologie virali e batteriche, in relazione al loro più facile controllo mediante interventi terapeutici e zootecnici ed ai più contenuti tassi di mortalità ad esse correlabili. Negli ultimi anni si è però registrata la crescente diffusione di agenti parassitari, quali Microsporidi e Mixosporidi, in grado di determinare notevoli perdite produttive e nei confronti dei quali ancora non si conoscono mezzi preventivi e terapeutici efficaci. Viene qui descritto un episodio di coinfezione enterica sostenuta da parassiti Microsporidi e Mixosporidi osservato in un allevamento di spigole (*Dicentrarchus labrax*). Nel periodo dicembre 2002-marzo 2003 sono state condotte analisi parassitologiche su 52 spigole provenienti da due vasche di un allevamento intensivo in cui si registravano da un paio di mesi tassi di accrescimento molto rallentati con mortalità a stillo (5-8 soggetti/giorno). Le vasche, strutturate in terra e completamente ricoperte in PVC, erano alimentate con acqua di pozzo a temperatura costante (20°C) e salinità intorno al 33-35‰. I primi due campionamenti, condotti in dicembre e gennaio su un totale di 20 spigole di peso compreso tra 40 e 230 g, hanno permesso di evidenziare la presenza di una grave infezione enterica da Microsporidi e Mixosporidi in tutti i soggetti esaminati. I 32 soggetti campionati nelle stesse vasche tra febbraio e marzo sono invece risultati negativi per Microsporidi, pur presentando sempre una diffusa infezione enterica da Mixosporidi. Tutti i soggetti infetti mostravano ipermelanosi e grave dimagrimento. L'esame necroscopico rilevava la pressoché totale assenza di grasso periviscerale ed un evidente assottigliamento della parete del tubo gastroenterico, peraltro sempre vuoto. L'esame parassitologico permetteva di rilevare nella parete intestinale la diffusa presenza di cisti con spore di *Sphaerospora dicentrarchi* (Myxozoa) e, solo nell'ultimo terzo, di numerose formazioni cistiche rotondeggianti di 50-300 µm di diametro. All'interno delle formazioni cistiche erano presenti numerose spore riconducibili a Microsporidi, di forma ovoidale, con dimensioni di circa 2,5×4 µm e con vacuolo posteriore cospicuo. Non si osservavano vescicole sporofore. Istologicamente le formazioni cistiche si rivelavano xenomi ed apparivano diffusi nella sottomucosa intestinale, per lo più isolati e, meno frequentemente, confluenti in aggregati. Gli xenomi erano caratterizzati dalla persistenza del nucleo della cellula ospite, ipertrofico ed in posizione centrale, da stadi di sviluppo del parassita frammisti a gruppi di spore mature e da una parete eosinofila. Attorno agli xenomi si evidenziava una reazione fibroblastica dell'ospite. La sottomucosa risultava totalmente interessata da flogosi e necrosi con scomparsa della mucosa. La parete intestinale era inoltre sempre interessata da infezione diffusa e grave da *S. dicentrarchi*. Poiché a tutt'oggi non risultano descritti microsporidi a tropismo intestinale ospite-specifici per *D. labrax*, si può supporre un ruolo della spigola quale ospite occasionale in presenza di serbatoi naturali.

## PARTICOLARI ASPETTI ANATOMO-ISTOPATOLOGICI IN CORSO DI ALCUNE MICOSI DEI TELEOSTEI. CONSIDERAZIONI PATOGENETICHE E NOTE IGIENICO-SANITARIE

F. Marino, G. Rapisarda, G. Licciardo, P. Maiolino<sup>o</sup>, G. De Vico, F. Conte\*

*Dip. di Sanità Pubblica Veterinaria - Sezione di Patologia Generale e Anatomia Patologica e \*Sezione di Ispezione degli Alimenti di O. A., Università degli Studi di Messina, Polo Universitario dell'Annunziata, 98168. <sup>o</sup>Dip. Di Patologia e Sanità Animale, Università di Napoli Federico II, Via F. Delpino 1, 80137, Napoli.*

Come per i vertebrati superiori, anche per i pesci le micosi rivestono una notevole importanza in patologia, e la descrizione di affezioni riconducibili a miceti risulta sempre più frequente anche per la diffusione degli allevamenti di tipo intensivo. L'obiettivo di questo studio è di contribuire alla conoscenza di particolari aspetti anatomo-istopatologici da noi osservati in corso di infezioni fungine in alcuni esemplari di spigola (*Dicentrarchus labrax*) e di pagro (*Pagrus pagrus*) provenienti da impianti di maricoltura, e in uno scalare (*Pterophyllium scalare*) proveniente da un acquario privato. Le spigole provenivano da un impianto sperimentale di allevamento, in iposalinità, a ciclo chiuso in montagna. Una cospicua quantità di soggetti presentava proliferazioni cotonose biancastre su varie porzioni del corpo. L'osservazione al microscopio di dette proliferazioni, nonché l'esame istopatologico (effettuato su organi e tessuti prelevati da soggetti malati ma ancora in vita) permettevano di documentare la diffusione sistemica dei miceti riferibili a *Saprolegniaceae* sia sulla cute che negli organi della cavità celomatica e all'interno dei vasi sanguigni. I pagri appartenevano ad uno stock ospitato in una vasca inn-shore con acqua di mare nella quale, da alcune settimane, si registravano continui decessi di pesci. I soggetti esaminati presentavano rigonfiamento a botte dell'addome, difficoltà natatorie e, in qualche caso, esoftalmo e lesioni erosive cutanee. All'apertura della cavità celomatica, appariva una massa unica, della grandezza di una noce, di consistenza compatta e di colorito grigiastro, che inglobava gran parte dei visceri. Il rene appariva coinvolto da lesioni nodulari di dimensioni variabili, da 1 a 5 mm, di colorito bianco-grigiastro, che interessavano il parenchima a tutto spessore, determinandone anche la deformazione del profilo. Istologicamente, sia la massa addominale, che le lesioni nodulari del rene, apparivano quali lesioni granulomatose costituite da una zona periferica caratterizzata da proliferazione fibroblastica e infiltrazione di mononucleati, ed una zona centrale, necrotica, nel cui contesto erano visibili numerose strutture filiformi, brunastre, allungate. Queste strutture si coloravano intensamente con il metodo PAS, e venivano quindi identificate come ife fungine. Lo scalare era stato inviato dal proprietario con la richiesta di un esame istopatologico di una massa neoformata (0,5 x 0,5 cm), pedunculata, di colorito uniforme grigio-biancastro, a superficie lievemente rugosa, localizzata nella regione peribuccale destra. Alla superficie di sezione la massa appariva omogenea, sia in tessitura che in colore, asciutta e leggermente stridente. L'esame istopatologico rivelava una derivazione dermica della neoformazione che appariva caratterizzata da un tessuto connettivo lasso quasi acellulare, con frammentate isole di metaplasia ossea formanti trabecole disordinate. Anche il tessuto osseo neoformato appariva acellulare. Nella porzione più profonda del nodulo, in prossimità del punto di impianto sulla mandibola, si repertava una struttura cistica all'interno della quale si documentavano alcune ife fungine frammentate a detriti di tessuto necrotico. Per quanto concerne le infezioni fungine dei teleostei allevati, tali patologie dovrebbero essere prese in considerazione in sede di controllo ufficiale e, in fase di cernita, da parte del responsabile dell'autocontrollo al fine di escludere i pesci colpiti dalla commercializzazione, e di ottenere importanti indicazioni circa lo stato igienico-sanitario dell'allevamento. Per gli aspetti anatomo-istopatologici descritti, sembra di notevole interesse l'infestazione massiva osservata nell'allevamento di spigole tenute in iposalinità spinta, accompagnata da gravi quadri di interessamento viscerale, evenienza rara in corso di "saprolegniosi"; degna di nota ci sembra anche la lesione produttiva, non neoplastica e non granulomatosa, documentata nello scalare, la quale può, secondo noi, essere ascritta ai c.d. pseudotumori micotici, ben noti nei vertebrati superiori, ma ancora non riportati nei pesci. Vogliamo inoltre segnalare la possibilità di introdurre anche nei teleostei, così come nei vertebrati superiori, il concetto di "pseudotumore post-flogistico" in riferimento alla lesione dei pagri, in quanto la lesione da noi osservata simulava macroscopicamente una neoformazione, la cui natura infiammatoria veniva dimostrata solo istologicamente.

## USO DEGLI INDICATORI ISTOPATOLOGICI, IN CAVEDANO E TROTE, NEL MONITORAGGIO DI UN ECOSISTEMA FLUVIALE

A. Paolini<sup>1</sup>, M. Berti<sup>1</sup>, J. Schwaiger<sup>2</sup>, A. D'Angelo<sup>1</sup>, C. Giansante<sup>1</sup>, N. Ferri<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale" – Teramo

<sup>2</sup> Department of Ecology - Bavarian State Agency for Water Resources – Wielenbach (Germany)

Lo studio, costituito da un monitoraggio multidisciplinare effettuato in due fiumi abruzzesi, sottolinea l'importanza dell'istopatologia nel monitoraggio ambientale degli ecosistemi fluviali. Trote fario (*Salmo trutta fario*) del fiume Aterno e cavedani (*Leuciscus cephalus*) del fiume Vomano, sono stati campionati in inverno ed in primavera. Le indagini istopatologiche hanno riguardato branchie, reni e fegato ed hanno rivelato lesioni infiammatorie e degenerative, interpretate come segno precoce (early warnings) di stress ambientale. Le lesioni, valutate in maniera semiquantitativa secondo una scala di gravità, sono state comparate con i risultati di esami effettuati in campioni di acqua e di macroinvertebrati effettuati negli stessi fiumi, che hanno confermato alterazioni dell'ecosistema osservato.

## DISTRIBUZIONE DI METALLI IN TRACCIA NELL'ECOSISTEMA DEL LAGO GRANDE DI AVIGLIANA (PROV. DI TORINO): STUDIO PRELIMINARE

M.C. Abete, P. Palmegiano, R. Alfieri<sup>2</sup>, S. Gavinelli, G. Forneris<sup>2</sup>, M. Prearo<sup>1</sup>

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Laboratorio di Sicurezza Ambientale, Torino*

<sup>1</sup> *Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Sezione di Torino, Ittiopatologia e Acquacoltura, Torino*

<sup>2</sup> *Facoltà di Medicina Veterinaria – Dpt. Di Produzione Animale, Epidemiologia ed Ecologia, Grugliasco (TO)*

La contaminazione degli ecosistemi acquatici da parte di metalli pesanti è uno fra i problemi di tossicologia ambientale. Questi elementi chimici sono pericolosi perché non sono biodegradabili in tempi relativamente brevi e pertanto accumulandosi nell'ambiente, si diffondono lungo la catena alimentare, giungendo sino all'uomo.

L'obiettivo di questa ricerca è la valutazione della presenza di metalli pesanti (Arsenico, Cadmio, Cromo, Mercurio e Piombo) nelle parti edibili dei pesci del Lago Grande di Avigliana (provincia di Torino) e l'eventuale impatto che tali inquinanti hanno sulla fauna ittica della zona oggetto di studio. Questa ricerca si affianca ad un'analisi dell'inquinamento da parte dei metalli sopra elencati, della catena trofica del sistema lacustre in questione. L'integrazione dei due lavori permette quindi una valutazione più accurata del grado di contaminazione dell'area indagata.

La fauna ittica presente nel Lago Grande è composita, costituita prevalentemente da Ciprinidi, Centrarchidi, Percidi, Esocidi, Cobitidi, ed Anguillidi. Sono state campionate le seguenti specie ittiche: tra i Ciprinidi, la scardola (*Scardinius erythrophthalmus*) ed il cavedano (*Leuciscus cephalus*), tra i Percidi il persico reale (*Perca fluviatilis*) e tra i Centrarchide il persico sole (*Lepomis gibbosus*), numericamente più rappresentati nelle acque di tale bacino.

Sono stati effettuati 230 campionamenti fra specie ittiche, sedimenti e acque in siti diversi del Lago Grande. La determinazione dei metalli è stata eseguita in spettrofotometria in assorbimento atomico mediante fornetto di grafite, per arsenico, cadmio, cromo e piombo; il mercurio invece è stato determinato mediante la tecnica dei vapori freddi dopo riduzione con cloruro stannoso.

I valori sono stati successivamente elaborati per via statistica: dalla loro osservazione si è potuto notare come non esistano problemi legati all'inquinamento da metalli pesanti sulle parti edibili dei pesci presi in considerazione. Le concentrazioni massime rilevate sono state di 0,16 ppm per l'arsenico, 0,08 ppm per il cromo, 0,31 ppm per mercurio e 0,21 ppm per il piombo. Per il cadmio tutti i campioni sono risultati inferiori al limite di quantificazione del metodo (0,01 ppm). Anche nella maggior parte dei campioni analizzati per cromo e mercurio le concentrazioni rilevate sono risultate non quantificabili. Si evidenzia però una traccia rilevante di cromo nei sedimenti del fondo del lago, probabilmente dovuto ad un accumulo pregresso, con un valore massimo di 200 ppm.

L'applicazione delle nuove leggi di tutela e la costruzione dell'anello fognario hanno sicuramente ridotto negli ultimi dieci anni l'apporto di inquinanti.

La continuazione di tali ricerche porterà ad avere un più preciso quadro della condizione ambientale di questo importante bacino lacustre.

## TRASFERIMENTO DI PESTICIDI ORGANOCCLORURATI (OC) E POLICLOROBIFENILI (PCB) NELLA CATENA TROFICA MARINA

M. Perugini, A. Gianmarino, M. Cavaliere, P. Mazzone °, V. Olivieri \*, M. Amorena

*Dipartimento di Scienze degli Alimenti - Università degli Studi di Teramo*

*° Veterinario Ufficiale ASL Teramo*

*\* Dirigente Responsabile S.S.I e C.V.P della pesca ASL Pescara*

La finalità di questo studio è stato quello di valutare i livelli e la distribuzione di sette congeneri di PCBs (28, 52, 101, 118, 138, 153, 180) e di alcuni OCs (*p,p'*-DDE, *p,p'*-DDD, *o,p'*-DDT, *p,p'*-DDT) in ambiente marino con particolare interesse alle specie ittiche autoctone presenti e pescate lungo il litorale abruzzese. Essendo degli inquinanti organici che, per le loro caratteristiche chimico-fisiche tendono a bioaccumularsi lungo le catene trofiche sono state selezionate delle specie poste a differenti livelli della catena trofica marina con l'intento di valutarne un eventuale bioaccumulo. Inoltre i mitili, organismi stanziali e filtratori, sono stati utilizzati come bioindicatori di inquinamento per le acque mentre i crostacei, organismi detritivori e necrofagi, come bioindicatori per i sedimenti.

Sono state esaminate 4 specie di pesci (*Scomber scombrus*, *Sardina pilchardus*, *Engraulis encrasicolus*, *Mullus barbatus*), 3 specie di molluschi (*Totarodes sagittatus*, *Sepia officinalis*, *Mytilus galloprovincialis*), ed 1 specie di crostacei (*Nephrops norvegicus*). I campioni sono stati pescati lungo il litorale abruzzese nel periodo compreso tra marzo e dicembre 2002 e prelevati direttamente ai mercati ittici di Giulianova (TE) e Pescara (PE), ad eccezione delle cozze provenienti dagli allevamenti di Chioggia (VE) e Vasto (CH). Le porzioni edibili di ogni campione sono state sottoposte ad estrazione del grasso in Soxhlet ed il grasso ottenuto è stato purificato usando acido solforico concentrato (Pastor *et al.*, 1993). L'analisi è stata effettuata in GC-MS ad IE (Shimadzu GC-MS QP 5000 con autoiniettore Shimadzu AOC-20i) con colonna capillare Zebron ZB-5 30m, 0.25mm ID, film 0.25µm. La lettura è stata condotta in SIM impostando uno ione diagnostico ed uno di conferma per ogni PCB. La valutazione quantitativa è stata effettuata con il metodo dello standard interno. Tali condizioni hanno permesso di raggiungere livelli di sensibilità analitica di 5 ppb per i congeneri 28, 52, 101, 118, 138 e 153, e di 10 ppb per il congenere 180.

Tutti i campioni analizzati sono risultati positivi ai PCBs. Il 138 ed il 153 sono i congeneri che hanno riportato le maggiori concentrazioni, mentre il 28 è stato l'unico per il quale sono stati rilevati valori inferiori al limite di sensibilità analitico. Le specie appartenenti al gruppo del pesce azzurro sono risultate essere le più contaminate mentre i cefalopodi hanno riportato le concentrazioni più basse. In una valutazione di tipo geografico effettuata utilizzando organismi stanziali differenze significative sono state riscontrate solo nei mitili dove le concentrazioni ritrovate nei campioni di Chioggia hanno riportato valori doppi rispetto a quelle di Vasto. Le differenze stagionali, anche se presenti, non sono invece di facile interpretazione. Gli OCs fatta eccezione la seppia che ha riportato sempre valori al di sotto del limite di sensibilità analitica, sono stati riscontrati in tutte le specie e le concentrazioni più elevate nelle specie poste ai vertici della catena trofica. L'attività di metabolizzazione del DDT nelle diverse specie è stata confermata dalle elevate concentrazioni ritrovate per il *p,p'*-DDE. Il rapporto DDE/DDT ha riportato il valore più elevato negli scampi e questo potrebbe essere legato alla maggiore efficienza metabolica di questo organismo. I valori di  $R^2$  (- 0.75 e - 0.66) trovati tra le concentrazioni di DDE e DDT nei pesci pelagici ed in quelli stanziali hanno mostrato una proporzionalità inversa, ad indicare una non recente contaminazione.

## **INDAGINE PRELIMINARE SULLA PRESENZA DI RESIDUI IN MANGIMI COMPLETI PER L'ACQUACOLTURA: RICERCA DI ARSENICO, CADMIO, CROMO, MERCURIO E PIOMBO**

M.C. Abete, M. Prearo, S. Andruetto, D. Pavino, S. Colussi, R. Tarasco, F. Agnetti<sup>1</sup>, C. Ghittino<sup>1</sup>

*C.Re.A.A. - Centro di Referenza Nazionale per la Sorveglianza ed il Controllo degli Alimenti per gli Animali – IZS Torino*

<sup>1</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche - Perugia

La ricerca dei metalli pesanti rappresenta uno degli obiettivi prioritari dell'attività di vigilanza e di controllo sui mangimi. In particolare, la necessità di effettuare un monitoraggio della presenza di tali elementi, risulta essenziale per poter verificare che il livello di concentrazione di queste sostanze sia inferiore ai limiti massimi consentiti dalla legge. Il contenuto massimo ammesso nei mangimi completi per pesci è regolamentato dal Decreto 23 dicembre 2002, n° 317, nel quale vengono indicati i limiti, espressi in mg/kg, per arsenico, cadmio, mercurio e piombo. Per quanto riguarda il cromo ci si attiene alle indicazioni del Piano Nazionale Alimentazione Animale. Nel primo semestre di attività del Centro di Referenza Nazionale per la Sorveglianza ed il Controllo degli Alimenti per Animali, sono stati analizzati 36 mangimi completi commerciali utilizzati in trotticoltura, prelevati in alcuni impianti dell'Italia settentrionale e centrale. Tutti i campioni analizzati erano destinati alla fase d'ingrasso-finissaggio delle trote ( $\varnothing$  pellet 5 mm). Per una maggior rappresentatività della campionatura, ogni campione (2000 g) era costituito da un pool di prelievi effettuati in sacchi diversi della partita presente in allevamento. La determinazione di arsenico, cadmio, cromo e piombo è stata condotta mediante spettrofotometria di assorbimento atomico con atomizzazione elettrotermica e correzione del fondo con effetto Zeeman, utilizzando il metodo delle aggiunte standard per ogni campione, al fine di ridurre le interferenze della matrice. La ricerca del mercurio invece è stata eseguita in spettrofotometria di assorbimento atomico con la tecnica dei vapori freddi, come previsto dal D.M. del 14/12/1971. I limiti di quantificazione (LOQ) delle procedure utilizzate sono: arsenico 0,85 ppm, cadmio 0,01 ppm, cromo 0,80 ppm, mercurio 0,07 ppm e piombo 0,04 ppm. Su tutti i campioni è stata inoltre calcolata l'umidità al fine di esprimere il risultato finale al tasso del 12%, come previsto dal Decreto n° 317. In tutti i campioni di mangimi esaminati per arsenico, non si è mai superato il limite massimo consentito di 4 ppm con tenore medio di 2,46 ppm. Per il cadmio invece, in due campioni si è potuto rinvenire il superamento del contenuto massimo (0,5 ppm), con concentrazioni di 0,51 ppm e 0,56 ppm (tenore medio 0,20 ppm). Le analisi per il mercurio non hanno mai posto in evidenza il superamento del limite di quantificazione del metodo, a fronte di un livello massimo consentito di 0,1 ppm. Nel caso del piombo, in tutti i campioni è stata rinvenuta una concentrazione significativa, ben al di sopra del LOQ (valore medio pari a 0,24 ppm), ma decisamente inferiore al contenuto massimo consentito di 5 ppm. Il D.M. n° 317 non fissa alcun limite per il cromo, mentre il Piano Nazionale di Vigilanza e Controlli Sanitari sull'Alimentazione degli Animali prevede per tale metallo un limite massimo tollerabile di 3 ppm; nessun mangime analizzato ha superato tale valore: la concentrazione più elevata riscontrata è stata di 1,32 ppm, con un tenore medio pari a 1,04 ppm. Le basse concentrazioni di arsenico, cadmio, cromo e piombo e l'assenza di mercurio, denotano come i mangimi per trotticoltura vengano prodotti nel rispetto della legislazione vigente. Il riscontro di questi metalli indica tuttavia come possa sussistere la possibilità di contaminazione della filiera. La presenza di questi elementi potrebbe inoltre costituire un rischio per la salute ed il benessere del pesce.

## PRESENZA DI PIOMBO NELLA PARTE EDIBILE DI PESCI DI CATTURA E D'ACQUACOLTURA: UN ANNO DI ATTIVITA'

M.C. Abete, D. Pavino, R. Tarasco, B. Campo Dall'Orto<sup>1</sup>, S. Gavinelli, E. Pavoletti<sup>1</sup>, M. Prearo<sup>1</sup>

*Laboratorio di Sicurezza Ambientale – IZS Torino*

<sup>1</sup> *Sezione di Torino – Ittiopatologia e Acquacoltura – IZS Torino*

Il Regolamento CE n° 466/2001 dell'8 marzo 2001, modificato il 6 febbraio 2002 (Reg. CE n° 221/2002) prevede che per tutelare la salute pubblica, debbano essere stabiliti tenori massimi per alcuni contaminati nelle derrate alimentari. Sono pertanto fissate delle concentrazioni massime, espresse in mg/kg di peso fresco (ppm) che, per il piombo nei prodotti ittici, variano a seconda della specie considerata: da 0,2 ppm a 0,4 ppm nei pesci, da 0,5 ppm a 1,5 ppm in crostacei, molluschi cefalopodi e bivalvi. L'assorbimento di piombo può costituire un grave rischio sanitario, in quanto può essere causa di patologie cardiovascolari ed in caso di intossicazione cronica (saturnismo) portare a problemi renali, neurologici e di anemia. Gli organismi acquatici tendono a concentrare il piombo (biomagnificazione) nel proprio organismo; i molluschi bivalvi presentano una maggior concentrazione di metallo rispetto ai pesci ed ai crostacei, in quanto assumono il piombo sia attraverso l'acqua che attraverso il particolato: ecco perché la legislazione fissa tenori decisamente più elevati in questa tipologia di prodotto. Nell'arco del secondo semestre 2002 - primo semestre 2003, sono stati analizzati complessivamente 155 campioni suddivisi in 129 di cattura e 26 d'acquacoltura. Tra i campioni derivanti da attività di pesca, 83 sono rappresentati da pesci teleostei (11 dulciacquicoli e 72 marini), mentre 12 sono rappresentati da crostacei, 32 da molluschi cefalopodi e 2 da molluschi bivalvi. Dei campioni derivanti da attività d'acquacoltura, 20 provengono da siti continentali (specie dulciacquicole) e 6 marini. I siti di campionamento coincidono con il territorio di competenza dell'Istituto di Torino (Valle d'Aosta, Piemonte e Liguria) e parte dell'alto Tirreno (Toscana settentrionale). La determinazione del piombo è stata condotta mediante spettrofotometria di assorbimento atomico, con atomizzazione elettrotermica e correzione del fondo tramite effetto Zeeman, con un limite di quantificazione del metodo pari a 0,04 ppm. I valori massimi riscontrati nelle varie tipologie di prodotti ittici esaminati, sono stati: 0,75 ppm in salpa (*Salpa salpa*), 0,11 ppm in luccio (*Esox lucius*), 0,06 ppm in orata (*Sparus aurata*), branzino (*Dicentrarchus labrax*) e trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*) d'allevamento. Nei campioni di crostacei analizzati, il livello più elevato è stato di 0,15 ppm in pannocchia (*Squilla mantis*); nei molluschi bivalvi, la concentrazione massima rinvenuta in mitili (*Mytilus galloprovincialis*) è stata di 0,91 ppm, mentre nei molluschi cefalopodi il tenore più elevato di piombo (0,49 ppm) è stato riscontrato in moscardino (*Eledone cirrosa*). Dai risultati ottenuti si evidenzia come i tenori di piombo siano maggiori nei molluschi rispetto i pesci ed i crostacei. E' da notare come in un unico esemplare di salpa, sia stata rinvenuta una concentrazione superiore al limite stabilito dal Regolamento CE (0,20 ppm): nonostante ciò, la concentrazione media ottenuta dalle analisi di tutti i pesci marini di cattura è pari a 0,09 ppm, valore decisamente inferiore al limite di legge. Infine è da evidenziare, come già dichiarato in lavori analoghi per altri metalli, come il prodotto di acquacoltura risulti essere meno contaminato rispetto al pesce di cattura. Nel corso degli ultimi anni il tenore di piombo negli alimenti è sensibilmente diminuito, anche grazie alla riduzione delle emissioni nell'ambiente. Appare comunque opportuno proseguire in questa tipologia d'indagine, come previsto dal Regolamento Comunitario, per verificare il reale livello di inquinamento da piombo nei prodotti ittici di cattura.

## **CARATTERISTICHE CHIMICO-CLINICHE IN SIERO DI ORATA (*SPARUS AURATA*) DURANTE UN EPISODIO DI *WINTER DISEASE***

L. Ravarotto, D. Pagan, A. Marin, F. Borghesan, A. Manfrin, L. Selli, G. Bovo

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro (Pd)*

La “Winter Disease” (WD) è una sindrome ad eziologia incerta che si manifesta esclusivamente nell’orata di allevamento, colpendo i soggetti al termine del loro primo anno di vita, durante il periodo inverno-primavera. Attualmente, in Italia la malattia si presenta con minore incidenza rispetto al passato, tuttavia gli episodi possono rivelarsi ancora particolarmente gravi caratterizzati da una mortalità elevata che, in alcuni casi, raggiunge il 60% dei lotti interessati. Pertanto, al fine di approfondire le indagini sulle cause dell’insorgenza di tale patologia e sulla sua evoluzione, si è ritenuto di affiancare alle abituali ricerche di tipo infettivistico e parassitologico l’analisi relative ad alcuni parametri chimico clinici sul siero.

Durante un episodio di WD, verificatosi in un allevamento situato nella laguna veneta nella primavera del 2003, sono stati effettuati prelievi ematici successivi, a distanza di circa 3 giorni l’uno dall’altro, sui quali sono state eseguite analisi biochimiche facenti parte di un profilo epato-renale, utilizzando metodi standardizzati specifici per questa categoria di animali messi a punto in ricerche precedenti. I dati sono stati elaborati statisticamente.

I risultati ottenuti hanno consentito di caratterizzare il quadro metabolico della fase iniziale della patologia, in particolare all’insorgenza dei sintomi. Durante tale stadio nei soggetti sintomatici è stato riscontrato un elevato catabolismo proteico, contraddistinto da una sensibile diminuzione della concentrazione ematica delle componenti di trasporto e dall’aumento delle proteine di fase acuta, contestualmente ad una grave carenza energetica, attestata dai bassissimi livelli glicemici e dal calo di quelli lipemici considerati. Le fasi successive sono, invece, state caratterizzate da valori ematici, relativi agli stessi parametri, che attestano l’adattamento degli animali allo scompenso metabolico pregresso pur evidenziando l’alterazione di alcune frazioni proteiche quali, ad esempio, quelle deputate al trasporto l’ossigeno. Infine, l’analisi dell’andamento dei rilievi ambientali (temperatura e ossigeno disciolto) e dello stress metabolico indirizzano a correlare l’interazione di questi parametri con il picco della mortalità registrata.

Lo studio effettuato indica l’opportunità di utilizzare i parametri ematochimici, in un sistema di valutazione integrato, quale strumento efficace nella comprensione delle manifestazioni patologiche in atto o, addirittura, quali fattori predittivi.

## UN CASO DI TECNOPATIA IN GIOVANILI DI CERNIA BRUNA, *EPINEPHELUS MARGINATUS* (LOWE, 1834), ALLEVATI IN INTENSIVO

F. Di Nocera<sup>1</sup>, P. Di Marco<sup>2</sup>, A. Priori<sup>2</sup>, L. Alborali<sup>3</sup>, D. Gelmetti<sup>4</sup>, G. Marino<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*SMEG Italia s.r.l. – Latina*; <sup>2</sup>*ICRAM – Roma*; <sup>3</sup>*I.Z.S. Lombardia ed Emilia Romagna – Brescia*; <sup>4</sup>*I.Z.S. Lombardia ed Emilia Romagna - Milano*

Lo studio descrive un caso di mortalità di giovanili di cernia bruna, *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834), riprodotti in cattività ed allevati in condizioni intensive. In particolare, si intende fornire un contributo all'interpretazione di un evento morboso che non trova riscontro in letteratura e riguarda una nuova specie d'interesse sia per la diversificazione delle produzioni d'acquacoltura sia per interventi di ripopolamento attivo. L'evento patologico ha interessato un lotto di circa 3.000 esemplari (PT = 94 g e LT = 16 cm) nel corso del secondo ciclo di allevamento. I giovanili di cernia sono stati allevati in vasche in cemento da 25 m<sup>3</sup> e alimentati *ad libitum* con una dieta mista costituita da mangime pellettato commerciale per spigole ed orate in associazione con pesce azzurro. L'evento è comparso nel gennaio 2003 in concomitanza con un brusco abbassamento della temperatura dell'acqua (13,5° C-10,5° C). Si è proceduto ad un campionamento di 45 esemplari sui quali sono stati effettuati analisi chimico-cliniche, esami anatomo-patologici, isto-patologici, virologici, batteriologici e parassitologici. All'esame clinico numerosi esemplari hanno mostrato alterazioni comportamentali rimanendo isolati sul fondo, fuori dalle tane artificiali, con un evidente atteggiamento letargico ed un nuoto lento. E' stata rilevata anche una drastica riduzione dell'attività alimentare dei pesci a cui sono seguiti episodi di mortalità cronica. Complessivamente, oltre il 50% del lotto in allevamento ha manifestato sintomi clinici e la mortalità ha riguardato il 20% degli esemplari. All'esame autoptico esterno i soggetti campionati presentavano una livrea brillante e tipica della specie ed un moderato stato di dimagrimento. Il 20% dei soggetti presentava anche petecchie emorragiche localizzate alla base delle pinne ventrali e sulla parete addominale. All'esame autoptico interno tutti gli esemplari avevano il canale alimentare vuoto, un'evidente epatomegalia ed una colorazione verdastra simil-colestatica generalizzata associata ad una ridotta consistenza dell'organo. Nonostante lo stato di digiuno, la cistifellea risultava quasi vuota con bile fluida e limpida. L'esame microscopico non ha evidenziato la presenza di endo/ectoparassiti sulla cute, sulle branchie, nell'intestino e nella cistifellea. L'esame istologico del fegato ha mostrato steatosi multifocale e degenerazione idropica epatocitaria, presenza di epatociti aumentati di volume contenenti glicogeno con citoplasma chiaro e piccoli granuli intensamente PAS positivi e rari stampi biliari. Le analisi plasmatiche del profilo epatico e lipidico nonché del tasso glicemico hanno indicato alterazioni significative di alcuni parametri nei soggetti sintomatici rispetto ai valori misurati su soggetti dello stesso lotto di origine ed allevati in un altro impianto in analoghe condizioni (controllo). Il confronto statistico ha mostrato negli esemplari sintomatici livelli significativamente più bassi di glucosio e colesterolo e valori più elevati dell'attività enzimatica di AST e LDH rispetto al controllo. L'esame batteriologico ha rivelato, per un numero limitato di soggetti, la presenza di batteri appartenenti al genere *Vibrio* resistenti ai diversi chemioterapici. L'esame virologico (RT-PCR), volto alla ricerca di Nodavirus, ha dato esito negativo. I risultati delle diverse indagini hanno consentito di ipotizzare un caso di tecnopatia la cui eziopatogenesi potrebbe essere ricondotta a fattori ambientali quali la bassa temperatura dell'acqua e/o a fattori nutrizionali possibili responsabili di un'alterazione del metabolismo.

## CASO DI GRANULOMATOSI SISTEMICA IN OMBRINA BOCCADORO (*ARGYROSOMUS REGIUS*) E RAFFRONTO CON LE LESIONI ISTOLOGICHE PRESENTI NELL'ORATA

C. Ghittino, E. Manuali, M. Latini, F. Agnetti, F. Rogato<sup>1</sup>, R. Agonigi<sup>1</sup>, S. Colussi<sup>2</sup>, M. Prearo<sup>2</sup>

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche - Perugia*

<sup>1</sup> *Skretting - Mozzecane (VR)*

<sup>2</sup> *Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta - Torino*

La granulomatosi sistemica è stata descritta inizialmente nell'orata d'allevamento, dove ha decorso tipicamente cronico ed è responsabile di accrescimento ridotto e mortalità a stitico. Può colpire anche il rombo allevato intensivamente, provocando perdite economiche ragguardevoli. Trattasi di una patologia di origine nutrizionale, che si verifica con la somministrazione di diete carenti in vitamina C e del complesso B, in seguito a formulazioni improprie o lungo stoccaggio dei mangimi. In alcune specie ittiche, in particolare l'orata, tali deficienze provocano ipertirosinemia con deposito di cristalli di tirosina in vari organi, il che determina una forte reazione infiammatoria locale, con formazione di granulomi, che si manifestano macroscopicamente come noduli. Le lesioni iniziali riguardano il rene, ma con il progredire del quadro anche milza, fegato, mesentero, cuore, occhio e derma vengono generalmente interessati.

Un caso di granulomatosi sistemica è stato recentemente rinvenuto in Italia nell'ombrina boccadoro (*Argyrosomus regius*), specie emergente per la maricoltura mediterranea. Tale scienide, allevato intensivamente, veniva alimentato con mangimi commerciali per spigole e orate, esibendo una crescita molto rapida. Ad una taglia compresa tra 1 e 2 Kg si è però verificata una mortalità di un certo rilievo, con pesci che presentavano esoftalmo accompagnato da cheratite e/o cataratta, nonché arrossamenti ed ulcerazioni cutanee associate a presenza di noduli biancastri. All'apertura della cavità celomatica, rene, milza, fegato e cuore apparivano tempestati da formazioni nodulari di varie dimensioni. L'esame batterioscopico, condotto per schiacciamento dei noduli e colorazione di Ziehl-Neelsen, non ha evidenziato presenza di germi acido-resistenti, così come la semina su terreno di Loewenstein-Jensen non ha determinato crescita di colonie di micobatteri e nocardie. Lo stesso esame batteriologico standard, condotto su agar sangue, è risultato negativo per *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida*. Esclusa l'origine infettiva del problema, il sospetto è caduto su una causa dietetica, visto che i requisiti nutrizionali di questa specie ittica non sono ben noti e visto che, stante la sua rapida crescita, necessita con ogni probabilità di un maggior apporto vitaminico nel mangime rispetto a quanto necessitano spigole e orate. Tale carenza avrebbe determinato un'alterazione del catabolismo della tirosina, con successiva comparsa della granulomatosi sistemica. Le orate del medesimo impianto di maricoltura, alimentate con gli stessi lotti di mangimi somministrati alle ombrine, non hanno comunque manifestato alcuna lesione riconducibile al fenomeno in questione.

Il presente lavoro descrive il quadro istopatologico della granulomatosi sistemica nell'ombrina boccadoro, raffrontandolo con quello evidenziato nell'orata in un episodio di malattia rilevato in un altro allevamento italiano.

## LA DENSITÀ E' UN PARAMETRO DA REGOLAMENTARE NELL'ALLEVAMENTO DELLA SPIGOLA? RISULTATI DI TEST DI STRESS A DIVERSE DENSITA' SULLO STATO IMMUNITARIO E LA RISPOSTA FISIOLOGICA ALLO STRESS

G. Marino<sup>1</sup>, P. Di Marco<sup>1</sup>, M. Bagni<sup>1</sup>, A. Priori<sup>1</sup>, M.G. Finoia<sup>1</sup>, L. Zanella<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ICRAM, Via Casalotti 300, 00166 Rome, Italy

<sup>2</sup> Centro Ittico Sperimentale, Bonello Via della Sacca 9 45018 Porto Tolle (RO)

E' noto che elevate biomasse in allevamento riducono la qualità dell'acqua e aumentano le interazioni sociali tra i pesci, con possibili effetti sullo stato di salute e di benessere dei pesci allevati. Limiti alle densità da utilizzare negli allevamenti sono stati recentemente proposti da enti certificatori (es. produzioni biologiche) e da enti governativi, quali il Consiglio d'Europa (Questionnaire to T-AP 97-12, Recommendation for the Welfare of Farmed Fish) per garantire produzioni di elevata qualità secondo principi etici. La maggior parte delle conoscenze sugli effetti della densità di allevamento riguardano specie d'acqua dolce. Nella spigola le evidenze scientifiche sono scarse e non consentono di stabilire se elevate densità di allevamento rappresentino un fattore di rischio in associazione a ridotti livelli di benessere e/o a uno compresso stato di salute. Questo studio valuta gli effetti della densità di allevamento sulla risposta fisiologica di stress e sulla risposta immunitaria innata in spigole immunostimate con  $\beta$ -glucani e sottoposte a test di stress acuto e cronico.

Sei gruppi di spigole sono state allevate per 35 giorni a tre densità di allevamento (7, 14 and 21 kg/m<sup>3</sup>) in vasche da 12 m<sup>3</sup> a circuito chiuso. Tre gruppi a diversa densità (150,2 g) sono stati alimentati con una dieta addizionata di 0,5% of Ergosan<sup>®</sup> (glucano estratto da alghe) al 2% del peso vivo per 15 giorni, dal 7° al 21° giorno. Tre gruppi (149,2 g) hanno ricevuto la stessa dieta senza immunostimolanti (controllo). Un test di stress acuto è stato condotto al 35° giorno riducendo la quantità di acqua nelle vasche per 15 min. Il prelievo di sangue è stato condotto su 10 spigole per gruppo al giorno 0, 7 e 35 prima del test di stress e 30 min, 6, 24, 48, 72 ore e 10 giorni dopo il test di stress. Test di laboratorio su siero: cortisolo, glucosio, proteine totali, colesterolo, trigliceridi, acidi grassi non esterificati, complemento e lisozima. L'attività respiratoria dei leucociti a livello intra ed extracellulare (NBT, Cyt C) è stata misurata al giorno 7, 35 e 45.

Test cronico (periodo 0-35 giorni): la densità di allevamento non modifica i livelli di cortisolo e dei metaboliti. L'attività del complemento è significativamente ridotta nei gruppi allevati ad alta densità, ma aumenta significativamente dopo somministrazione di  $\beta$ -glucani. I valori di lisozima non sono influenzati dalla densità di allevamento e sono sempre significativamente più alti nelle spigole immunostimate rispetto ai controlli. L'attività respiratoria dei leucociti (NBT e Cyt C) è significativamente più alta nelle spigole ad alta densità.

Test acuto (1-10 giorni): in tutti i gruppi sperimentali i valori di complemento, lisozima, cortisolo, glucosio, proteine totali ed acidi grassi liberi variano significativamente dopo l'induzione di uno stress acuto. Non variano i trigliceridi ed il colesterolo. La densità di allevamento e la somministrazione di  $\beta$ -glucani condizionano la risposta allo stress in termini quantitativi e con effetti sulla capacità adattativa allo stress.

I risultati di questo studio indicano un effetto negativo della densità di allevamento sulla risposta immunitaria innata nella spigola. Si dimostra un effetto immunomodulatorio dei  $\beta$ -glucani nelle spigole allevate ad elevata densità e/o sottoposte a prove di stress, concludendo sull'importanza di adottare "buone pratiche d'allevamento" per le produzioni intensive di questa specie.

## **ANOMALIE BILATERALI DELL'OPERCOLO E RECUPERO DELLA LORO INTEGRITÀ ANATOMICA IN ORATA (*SPARUS AURATA*, L. 1758)**

P. Beraldo, S. Maschio, M. Galeotti, B. Canavese

*Università degli Studi di Udine, Dipartimento di Scienze della Produzione Animale, Unità di Patologia Generale e Ittiopatologia, via delle Scienze, 206 – Udine*

Tra le malformazioni della regione cefalica, le anomalie che colpiscono l'apparato opercolare sono tra le deformazioni esterne più frequenti e possono interessare oltre il 50% di una popolazione allevata, soprattutto di orata. Tale anomalia può essere monolaterale o bilaterale, tuttavia la frequenza con cui si osservano anomalie del complesso opercolare in entrambi i lati è decisamente minore rispetto alla monolateralità (5-20% vs 80-95%). Queste anomalie, anche se manifeste in modo molto grave, sono biocompatibili. Ciò nonostante esse possono causare una minore resistenza degli individui colpiti verso gli stress ambientali, una maggiore predisposizione alle infezioni branchiali e una drastica ipofunzionalità del sistema di respirazione durante la fase di suzione e espulsione dell'acqua, soprattutto nei soggetti con anomalia bilaterale.

Come già precedentemente discusso, le anomalie del complesso opercolare possono col tempo diminuire di gravità fino a raggiungere una completa rigenerazione della struttura, o comunque modificare il loro aspetto con un progressivo miglioramento dell'immagine.

In quest'ottica si è voluto analizzare il processo di recupero a integrità anatomica di soggetti portatori di anomalie opercolari bilaterali, con livello di gravità per ciascun lato piuttosto elevato.

Per l'espletamento dell'indagine sono state utilizzate 800 orate con anomalie bilaterali e aventi un peso medio iniziale di 0,8 g. Le orate sono state allevate secondo parametri standard di allevamento per 16 mesi. Inizialmente a intervalli mensili e in seguito più dilazionato nel tempo, l'intera popolazione è stata controllata al fine di valutare l'entità del processo di recupero verso l'integrità anatomica. In tal senso, ogni individuo è stato esaminato su entrambi i lati per conteggiare gli individui divenuti normali (entrambe le strutture opercolari rigenerate), monolaterali (un solo lato normale) o ancora bilaterali. In totale sono state effettuate 7 valutazioni in corrispondenza delle quali, solo i soggetti bilaterali sono stati reimessi in vasca, mentre i soggetti normali e monolaterali sono stati sacrificati e sottoposti a valutazione allo stereomicroscopio. La valutazione dei campioni è stata realizzata seguendo i criteri messi appunto dagli autori precedentemente (Beraldo *et al.*, 2002).

I risultati confermano che, anche nei soggetti portatori di anomalie opercolari molto gravi, quali quelle bilaterali, può compiersi il ripristino delle condizioni di normalità anatomica del complesso opercolare. Tale processo di recupero sebbene mostri un andamento diverso da quello dei soggetti con anomalie monolaterali, appare un fenomeno piuttosto vistoso.

## **ANOMALIE OPERCOLARI: “TESTE” E “CODE” DI AVANNOTTI DI ORATA (*SPARUS AURATA*, L. 1758) A CONFRONTO NEL RECUPERO DELLA INTEGRITÀ ANATOMICA**

P. Beraldo, S. Maschio, P. Benedetti, M. Galeotti, B. Canavese

*Università degli Studi di Udine, Dipartimento di Scienze della Produzione Animale, Unità di Patologia Generale e Ittiopatologia, via delle Scienze, 206 – Udine*

I sistemi di allevamento, la gestione degli stessi e le caratteristiche biologiche delle specie ittiche allevate possono essere causa di notevole eterogeneità all'interno di una popolazione. Poiché tale condizione può riflettersi negativamente sulle prestazioni produttive, le tecniche di allevamento su larga scala prevedono operazioni finalizzate alla selezione di taglia affinché vengano costituiti lotti di pesci di dimensione omogenea che, quindi, si suppone possano mostrare prestazioni produttive equiparabili. Da ciò deriva che da una popolazione di partenza si possano ottenere più gruppi di pesci, in particolare un gruppo di “teste” (i pesci di taglia maggiore), di medi e di “code” (i pesci di taglia minore), allevati quindi separatamente.

Sulla base di precedenti esperienze, riguardanti il recupero dell'integrità anatomica in orate affette da anomalie del complesso opercolare, è stata avanzata l'ipotesi che i differenti gruppi (teste, medi e code) si possano comportarsi in maniera difforme nei confronti del processo di recupero.

A tal fine sono stati utilizzati avannotti di orata, affetti da anomalie opercolare, provenienti da lotti di teste e code, aventi rispettivamente un peso medio iniziale pari a 1 e 0.6 g. I pesci sono stati suddivisi in 4 vasche da 800 l a formare i seguenti gruppi: 2 per le teste e 2 per code, costituiti da una vasca per categoria di soggetti con anomalie di minore gravità (PA con IRi [Indice Recupero integrità, Beraldo *et al.*, 2002] pari a 0.95) e una con soggetti affetti da anomalie gravi (MPT con indice IRi compreso tra 0.82-0.86). I pesci sono stati allevati per sette mesi e durante tale periodo i diversi gruppi sono stati esaminati con cadenza bimestrale, prendendo in esame l'intera popolazione in vasca al fine di conteggiare l'entità del recupero.

I risultati di questa indagine sono ulteriore conferma della capacità dell'orata di recuperare anomalie opercolari anche di elevata gravità, ma soprattutto è apparso evidente che tale processo non appare dissimile tra categorie di taglia diverse, quali le teste e le code.

## **LISTERIA MONOCYTOGENES IN PESCE FRESCO**

L. Decastelli, L. Chiavacci, E. Pivetta, F. Brusa

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

*Listeria monocytogenes* è un patogeno ubiquitario, normalmente presente nelle acque superficiali, nel suolo ed in ambienti contaminati con materiale fecale: facile risulta essere, quindi, la contaminazione alimentare ed il suo ingresso nel ciclo alimentare è dovuto essenzialmente al consumo di alimenti crudi (Husset et al., 2000)

I prodotti ittici sono continuamente esposti alle cariche microbiche presenti nell'acqua: particolare attenzione dovrebbe essere posta ai molluschi bivalvi allevati in aree costiere, attigue ad estuari ed esposte alle polluzioni urbane ed agricole. Sono stati dimostrati, infatti, casi di listeriosi umana imputabili a molluschi bivalvi consumati crudi (Plusquellec et al., 1998). Anche sulla superficie esterna dei pesci (muco, squame) è stata riscontrata la presenza di *Listeria* spp.: maggiormente a rischio sembrano essere i pesci di fondale di acqua dolce.

Studi americani, condotti su differenti tipologie di pesce crudo per la ricerca di *L. monocytogenes*, hanno evidenziato prevalenze variabili dal 3.6% al 29.5% in relazione alla specie esaminata (Hoffman et al., 2003). In Finlandia (Miettinen et al., 2001) sono state rilevate contaminazioni da *L. monocytogenes* pari al 12% del pesce esaminato. Sembra che le percentuali di positività aumentino allorquando si vadano ad analizzare pesci provenienti da acque tropicali: in India, ad esempio, si sono rilevate positività tra il 17.2% (pesci) e il 12.1% (molluschi bivalvi) (Jeyasekaran et al., 1996). Dati del Centro America mostrano percentuali superiori al 30% (Bianchini, 1999).

Scopo del lavoro è quello di verificare la prevalenza di *L. monocytogenes* in pesce fresco negli anni 2001, 2002 e 2003 (primo semestre) prelevato nei territori di competenza del nostro Istituto; i metodi utilizzati sono di tipo microbiologico (AFNOR V08-055/1997) ed immunoenzimatico - ELFA (AFNOR BIO 12/9-07/02).

I dati ottenuti, riportati nella tabella n° 1, mostrano, rispetto agli studi esteri, positività leggermente inferiori, e, sicuramente, con progressiva tendenza alla diminuzione.

Tabella n° 1

	anni		
	2001	2002	2003 1° sem.
analisi effettuate	112	91	22
positivi	13	7	1
% positività	11,61 %	7,69 %	4,55 %

Restano da valutare gli effetti che questo batterio può avere sul benessere dell'animale nelle diverse fasi dell'allevamento.

## ISOLAMENTO E CARATTERIZZAZIONE DI *LISTERIA MONOCYTOGENES* NELLA PRODUZIONE INDUSTRIALE DI SALMONE AFFUMICATO

A. Paparella, C. Chaves López, A. Serio, L. Santori, M. Martuscelli, G. Suzzi

*Dipartimento di Scienze degli Alimenti - Università degli Studi di Teramo - Via Spagna 1, 64023 Mosciano Stazione (TE)*

La capacità di *Listeria monocytogenes* di sviluppare sia a temperature di refrigerazione che a bassissime pressioni di ossigeno insieme alla sua alotolleranza ed alla distribuzione ubiquitaria rendono gli studi su questo microorganismo di particolare interesse per la sicurezza dei prodotti alimentari refrigerati con shelf-life estesa (ESL), come il salmone affumicato.

Sono stati studiati numerosi isolati di *Listeria monocytogenes*, ottenuti da campioni prelevati in uno stabilimento di produzione di salmone affumicato a freddo. I campioni erano relativi a salmoni refrigerati, semilavorati, prodotti finiti, macchinari, attrezzature e superfici di lavoro. Gli isolati sono stati caratterizzati fenotipicamente ed anche attraverso sierotipizzazione, e inoltre è stata valutata la dinamica di sviluppo a 4° C, 6° C e 9° C in presenza di differenti concentrazioni di NaCl.

I risultati hanno evidenziato che, in condizioni chimico-fisiche paragonabili a quelle del salmone affumicato, tutti i ceppi erano inibiti dalla conservazione a 4° C per 30 giorni e presentavano un trascurabile sviluppo a 6° C dopo 16 giorni, mentre la crescita avveniva rapidamente a 9° C (dunque in condizioni di abuso termico), in misura variabile a seconda dei ceppi.

L'aggiunta di NaCl al substrato ha reso ancora più evidente la diversità di comportamento dei ceppi, con un marcato effetto sia sulla durata della fase lag sia sull'andamento della curva di crescita.

## **LISTERIA MONOCYTOGENES IN PREPARAZIONI A BASE DI PESCE**

L. Decastelli\*, D. Adriano\*, S. Gallina\*, A. Barbaro\*, M. Garzena\*\*, A. Ferrari\*

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

\*\* Settore Vigilanza e Controllo degli Alimenti di Origine Animale - Regione Piemonte - Torino

*Listeria monocytogenes*, pur essendo conosciuto come patogeno da circa novant'anni, è stato individuato come agente di tossinfezioni alimentari solo una ventina di anni fa (M. Wagner et al., 2003). La listeriosi presenta un tasso di mortalità secondo solo al botulismo ma, rispetto a quest'ultimo, è decisamente più frequente (Giaccone, 2003).

La letteratura mostra che tale microrganismo è frequentemente veicolato da alcuni alimenti ed, in particolar modo, dal pesce affumicato (Rorvik, 2000): sembra, però, che la contaminazione del salmone affumicato non sia da imputarsi esclusivamente ad una scarsa qualità igienico-sanitaria della materia prima, bensì alla presenza della *Listeria* nell'impianto di trasformazione. È stato dimostrato, però, che la crescita di *Listeria monocytogenes* nel salmone affumicato, conservato sottovuoto ad una temperatura di 5° C può essere inibita dall'utilizzo di una flora lattica competitiva (Nilsson et al., 1999).

Con il D.M. 18/02/02, recepimento della Raccomandazione della Commissione n° 2001/337/CE, la Comunità Europea ha interesse a verificare e a quantificare le contaminazioni microbiche ed il rischio per il consumatore in seguito al consumo di salmone affumicato.

Scopo del lavoro è stato quello di verificare la prevalenza di *Listeria monocytogenes* in preparazioni a base di pesce, rappresentate in massima parte da salmone affumicato, commercializzate negli anni 2001, 2002 e 2003 (primo semestre) nei territori di competenza del nostro Istituto. I metodi utilizzati sono di tipo microbiologico (AFNOR V08-055 / 1997) ed immunoenzimatico - ELFA (AFNOR BIO 12/9-07/02). Le analisi ed i risultati ottenuti possono essere schematizzati nella tabella seguente:

	anni		
	2001	2002	2003 1° sem.
analisi effettuate	147	177	32
positivi	15	16	0
% positività	10,20 %	9,04 %	0,00 %

Numerosi sono gli studi che si sono interessati del problema *Listeria* nei prodotti a base di pesce: in Spagna le positività per *Listeria monocytogenes* in pesce affumicato sembrano assestarsi intorno al 22,3% (Dominguez et al., 2001). Uno studio danese (Jorgensen & Huss, 1998) ha rilevato una prevalenza, nel salmone affumicato a freddo, variabile dal 34 al 60%, mentre nei prodotti trattati termicamente la percentuale risulta decisamente più bassa (4-12%). In Norvegia salmone affumicato contenuto sottovuoto ha mostrato positività dell'11% (Rovik et al., 1995). In Giappone sono state rilevate positività del 5,4% sul salmone affumicato (Inoue et al., 2000).

Confrontando i risultati da noi ottenuti con quelli riportati dalla bibliografia, si può affermare che i livelli di *Listeria monocytogenes* da noi rilevati sono relativamente bassi e, sicuramente, mostrano positività decrescenti negli ultimi tre anni: questo fenomeno è sicuramente legato alle migliori e più mirate azioni preventive di tipo igienico-sanitario attuate dalle industrie per ridurre la pericolosa contaminazione ambientale.

## PRODUZIONE DI ISTAMINA IN PRODOTTI ITTICI FRESCHI IN FUNZIONE DELLA TEMPERATURA DI CONSERVAZIONE

P. Visciano, G. Campana\*, L. Annunziata\*, A. D'Aquilio

*Dipartimento di Scienze degli Alimenti – Università degli Studi di Teramo*

*\*Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale" di Teramo*

Il Decreto Legislativo 531/92 - attuazione della Direttiva 91/493/CEE – fissa i valori limite di istamina, pari a 20 mg/100 g, in pesci appartenenti alle famiglie *Scombridae*, *Clupeidae*, *Engraulidae* e *Coryphaenidae*, frequentemente coinvolti in episodi di avvelenamento da sgombroidi.

Nella presente indagine è stata valutata la produzione di istamina, in differenti condizioni di conservazione, sia in specie (sgombri, alici, sardine) per le quali è stabilito tale limite dalla normativa, sia in altre specie (sogliole, naselli) che solitamente rientrano nella dieta di bambini o anziani, soggetti a maggior rischio di intossicazione. Sono stati esaminati 30 esemplari di pesci appartenenti alle specie suddette, prelevati in due diversi campionamenti e suddivisi ciascuno in tre aliquote, di cui una da sottoporre ad analisi al momento dell'arrivo in laboratorio e le rimanenti dopo conservazione a 25° C per 24 ore e a 4° C per 72 ore. La determinazione dell'istamina è stata effettuata secondo la metodica di Eerola et al. (1993) modificata, che prevede una prima estrazione della matrice con acido perclorico, la successiva derivatizzazione con dansil cloruro e l'analisi cromatografica in HPLC a fase inversa con rivelatore UV.

Tutti i campioni esaminati immediatamente dopo il prelievo hanno sempre evidenziato livelli di istamina inferiori al limite di rilevazione della metodica (5 ppm). Tra i campioni analizzati dopo conservazione a 25° C per 24 ore, quelli per i quali sono stabiliti i livelli massimi dalla normativa hanno mostrato un contenuto di istamina piuttosto elevato e, in taluni casi, di molto superiore ai limiti di legge, con valori massimi di 110.6 mg/100 g nelle sardine e 146.5 mg/100 g nelle alici. Nelle restanti specie l'istamina è stata identificata soltanto in due campioni di sogliole, a livelli comunque molto bassi (valore massimo 1.3 mg/100 g), mentre nei campioni di naselli è risultata sempre inferiore al limite di rilevazione della metodica. Tra i campioni esaminati dopo 72 ore a 4° C, solo le alici hanno presentato livelli di istamina rilevabili (valore massimo 4.6 mg/100 g).

I risultati ottenuti mostrano come condizioni inadeguate di conservazione, con intervalli irregolari di tempo/temperatura, possono determinare la formazione dell'ammina in quantità elevate. In considerazione del fatto che la Food and Drug Administration, a seguito dei numerosi episodi di intossicazione, abbia fissato quale limite di pericolosità per quest'ammina il valore di 5 mg/100 g, è interessante osservare come nella nostra indagine tale limite sia stato abbondantemente superato in diversi campioni conservati a 25° C, mentre livelli prossimi ad esso siano stati raggiunti nelle alici tenute a 4° C.

Tra le strategie atte a prevenire la formazione di istamina nei prodotti ittici, il controllo costante della temperatura rappresenta senza dubbio il fattore principale da rispettare. Dal momento che la commerciabilità di un prodotto ittico è fortemente legata a una serie di fasi successive (cattura, manipolazione a bordo, trasporto e stoccaggio in depositi frigoriferi), è evidente come la sensibilizzazione di tutti gli operatori del settore ittico sia uno strumento indispensabile a garantire la distribuzione sul mercato di prodotti salubri e meglio conservabili.

# **TAVOLA ROTONDA**

***“PRINCIPALI PATOLOGIE  
NELLA MARICOLTURA MEDITERRANEA”***

## **ENCEFALO-RETINOPATIA VIRALE: ATTUALE SITUAZIONE NEL BACINO DEL MEDITERRANEO**

### ***ENCEPHALOPATHY AND RETINOPATHY: ACTUAL SITUATION IN THE MEDITERRANEAN AREA***

G. Bovo

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Viale dell'Università, 10 - 35120 LEGNARO (PD)*

L'encefalo-retinopatia virale (VER) conosciuta anche come necrosi del tessuto nervoso di origine virale (VNN) è una grave malattia caratterizzata da ampia diffusione geografica ed in grado di colpire diverse specie ittiche marine con lesioni a carico del sistema nervoso. La malattia è stata identificata nel bacino del Mediterraneo fin dal 1981 con episodi che hanno interessato esclusivamente stadi larvali e giovanili con una incidenza economica trascurabile.

A partire dall'estate 1995 si sono registrati, in molti allevamenti situati in aree geografiche diverse, gravi episodi di mortalità che hanno colpito anche soggetti adulti e sub-adulti e che avevano in comune la provenienza degli avannotti .

Da allora, la malattia ha rappresentato un serio rischio soprattutto nell'allevamento del branzino ma, da alcuni anni, la sua incidenza si è significativamente ridotta anche se vengono ancora registrati episodi con mortalità importanti.

In Italia la malattia è stata segnalata nella maggior parte delle avannotterie e delle aziende di ingrasso dove si è diffusa facilmente soprattutto per la mancanza di qualsiasi attività di controllo.

Oggi l'agente eziologico è presente in gran parte del bacino del mediterraneo ma l'impatto economico della malattia si è significativamente ridotto rispetto al periodo 1995–2000. Non mancano comunque episodi gravi in cui la mortalità, nei lotti colpiti, rimane particolarmente elevata, potendo superare valori del 70%. Negli impianti infetti, se non vengono attivate drastiche misure di controllo, il virus può permanere a lungo causando una malattia sub-clinica e rivirulentandosi in occasione di eventi stressanti ai quali possono conseguire gravi perdite. Sembra che le popolazioni colpite siano in grado di rispondere immunologicamente, con produzione di anticorpi neutralizzanti in grado di proteggerle da successive esposizioni al virus; purtroppo il livello di tale protezione tende a ridursi nel corso della stagione invernale. A questo proposito sono stati descritti episodi invernali, associati a sintomi tipici, e caratterizzati da mortalità limitate .

Per quanto riguarda il controllo della VER , la segnalazione di episodi di malattia in animali selvatici quali alcune specie di cernie, nonché l'isolamento dell'agente causale da animali asintomatici quali triglia (*Mullus barbatus*) e orata (*Sparus aurata*), suggeriscono che un eventuale piano di controllo si preannuncia particolarmente difficile e che, con ogni probabilità, solo l'impiego della vaccinazione possa essere preso in seria considerazione nella lotta alla VER.

## STATO SANITARIO DELLA MARICOLTURA IN ITALIA

### *SANITARY STATUS OF MARINE AQUACULTURE IN ITALY*

L. Corbari

*Associazione Piscicoltori Italiani*

La maricoltura italiana, intesa come l'allevamento di spigole, orate, saraghi, ombrine ed alcune specie minori o di nuova introduzione, si è assestata su una produzione di circa 20.000 tonnellate (A.P.I., 2002).

Le diverse tipologie d'allevamento (intensivo a terra, in gabbie a mare, estensivo) le caratteristiche strutturali e gestionali degli allevamenti, la loro diffusione sul territorio influenzano notevolmente la comparsa delle patologie.

Il quadro sanitario degli allevamenti di specie descritto è il frutto delle segnalazioni da parte di veterinari operanti negli allevamenti sulla base delle osservazioni cliniche e dei rilievi anatomico-patologici, suffragati quando possibile da analisi di laboratorio. Tali informazioni vengono raccolte da alcuni anni e permettono di osservare la diversa incidenza, lo sviluppo o la regressione di alcune patologie e di stimare il loro impatto economico.

Tra le patologie ad eziologia virale si deve segnalare la riduzione dell'incidenza della Nodaviriosi nel branzino.

Pasteurellosi (da *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*) e Vibriosi sono le patologie batteriche che maggiormente incidono nelle avanotterie, e in certi casi possono determinare perdite significative anche nei soggetti in fase d'accrescimento.

Tra le malattie parassitarie quelle maggiormente segnalate, soprattutto nelle valli ad allevamento estensivo sono i Mixosporidi e *Oodinium* spp.

Una decisa riduzione è stata osservata sia per quanto riguarda gli episodi di *Winter syndrome* nell'orata.

Il controllo delle patologie e la gestione sanitaria degli allevamenti si scontrano spesso con alcune limitazioni normative, quali la ridotta disponibilità di farmaci autorizzati in acquacoltura, che riducono le possibilità di intervento da parte degli allevatori e dei veterinari.

## STATO SANITARIO DELLA MARICOLTURA IN FRANCIA

### *SANITARY STATUS OF MARINE AQUACULTURE IN FRANCE*

A. Le Breton

*Ichthyopathologist, Aquaculture Health & Hygiene Consultant, Grenade sur Garonne, France*

Marine Aquaculture in France corresponds to the production of four species: *Sparus aurata* and *Dicentrarchus labrax* on both the Atlantic and Mediterranean coasts including Corsica for hatching and fattening, *Scophthalmus maximus* on the Atlantic coast and *Argyrosomus regius* on the Mediterranean coast.

External or coelozoic parasitic infestations have been the first pathology identified on Marine species, as in other productions. More recently, severe losses have been related to the occurrence of histozoic parasites, Microsporidian or Myxosporidian, for which no commercial and efficient treatments are available today. Field epidemiological data allowed to progress on the knowledge of the life cycle of *Enteromyxum leei* and to identify prophylactic measures to reduce the impact of the disease on the production.

Since the 90's, the main bacterial disease was Vibriosis induced by *Vibrio anguillarum* serotype I. With the extensive use of efficient vaccine, this disease is now in regression. In 1990/91, *Photobacterium damsela* var. *piscicida* was described in Corsica but never became a major problem. On Turbot, and under specific farming condition on Sea bass, *Aeromonas salmonicida* infections affect the production. But for the last five years, different vaccination programmes have been implemented successfully to control the disease. More recently, new bacterial problems have been suspected in the production of Marine species. If one of those is directly linked to the presence of a specific bacteria (Segmented Filamentous Bacteria in Sea bream), most of these problems seems related to modifications of the balance of heterotrophic bacterial flora, especially during the production of live feeds and the larval stages in hatcheries.

No major viral infections have to be reported on Marine productions. Nodavirus infections can be observed sporadically on Sea bass and Lymphocystis on Sea bream. In some occasion, the presence of Birnavirus in Rotifer culture has been suspected.

The improvement of the situation concerning the status of commercial vaccines and the use of Autologous vaccines on some occasions have improved the situation regarding the control of bacterial diseases and reduce the use of antibiotic. Vaccines against Vibriosis and Furunculosis under immersion/injection or oral delivery have been granted temporary authorisations and are applied extensively. Almost all the production of sea bass is now vaccinated at least by immersion at an early stage.

The evolution of the sanitary prophylactic methods, with the application of new products (Peroxide - Bromothymol ) in replacement of those recently banned have also contributed to the improvement of the sanitary situation in the production of Marine species in France.

## STATO SANITARIO DELLA MARICOLTURA IN SPAGNA CON PARTICOLARE ATTENZIONE ALLE MALATTIE PARASSITARIE

### *AN UPDATE ON THE HEALTH STATUS OF THE MARINE FISH FARMING IN SPAIN WITH PARTICULAR EMPHASIS IN THE EMERGING PARASITIC DISEASES*

F. Padrós

*Servei de Diagnòstic Patològic en Peixos. Facultat de Veterinària. Universitat Autònoma de Barcelona. 08193 Bellaterra (Barcelona), Spain.*

The marine fish aquaculture production in Spain is mainly represented by two different groups of species, according to the particular geographical situation of the Spanish coasts. Turbot (*Scophthalmus maximus*) is produced in the North Atlantic coast, mainly in the Galicia region, whereas in the Mediterranean coast, South Atlantic coast and Canary Islands, sea bream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) are the main cultured species. In the recent years, new emerging commercially cultured species such as sole (*Solea solea* and *Solea senegalensis*), tuna (*Thunnus thynnus*) mainly in the Murcia region, and blackspot seabream (*Pagellus bogaraveo*), have also been introduced into the market.

In the case of turbot, the main losses due to disease problems are associated with cases of Flexibacteriosis, Furunculosis, Vibriosis (*Listonella (Vibrio) anguillarum*) as the main bacterial diseases and Enteromyxidiosis, systemic ciliatosis and also Cryptosporidiosis (but in a lower extent) as the main parasitic diseases. For sea bream and sea bass, the spectrum of diseases is not especially different from the rest of the Mediterranean area. Nodavirus infection is the main viral disease threatening the sea bass production potential, although up to now, the direct impact (mortalities) of the disease on the Spanish farms has been negligible. Pasteurelosis and Vibriosis (due *Vibrio alginolyticus* and/or *Vibrio harveyi*) and Flexibacteriosis are the three main bacterial diseases affecting seabass and seabream with significant losses associated to outbreaks. Gill damage due to monogenean parasites in seabream and in seabass, and more recently Enteromyxidiosis due to *Enteromyxum leei* in seabream are also causing major chronic problems in several facilities.

From this general overview of the fish diseases panorama of the cultured marine species, two main emerging parasitic diseases should be highlighted: systemic ciliatosis in turbot and Enteromyxidiosis in turbot and sea bream.

Systemic ciliatoses are one the most important diseases of the turbot culture, with total losses reaching up to 20-40% in some stocks. The disease is associated with high temperatures and is produced by a histiophagous Scuticociliate identified as *Philasterides dicentrarchi*. The pathology of the disease is characterised by a general dissemination of the parasites through the abdominal organs, brain, skin and muscle. The treatments (baths) given to the affected fish are usually unsuccessful, due to internal distribution of the parasite and due to the advanced stage of the infection when symptoms are detected. Routine bath treatments with formalin or other disinfectant products also seem not to be very effective to prevent the spread of the disease. Although the disease mainly affects turbot, the potential transmission to other fish species should also be taken into account.

Enteromyxidiosis are also a new emerging and dramatic problem affecting both sea bream and turbot culture. *Enteromyxum (Myxidium) leei* is the responsible of the disease in sea bream and *Enteromyxum scophthalmi* is the counterpart in turbot. The disease affects the

intestinal mucosa, producing a progressive and dramatic destruction of the epithelial layer of the intestine. As a consequence of the lesions in the gut, the fish cannot digest and absorb properly the nutrients given with the food. As a result, the affected fish show a progressive weight loss and terminal cachexia. The disease normally affects big fish (sometimes commercial-size fish), increasing the economical significance of the losses generated by the outbreaks.

Nowadays, no available and effective treatments have been described for these two groups of pathologies. This lack of suitable treatments, the number of cases detected and the impact of the heavy losses produced by disease outbreaks are the main reasons for the major concern the Spanish marine aquaculture. Different studies on the epidemiology, pathogenesis, prophylaxis and treatment have been carried out in Spain and in other Mediterranean countries in order to control the disease.

## STATO SANITARIO DELLA MARICOLTURA IN GRECIA E NEL MAR EGEO ORIENTALE. TRATTAMENTI E PREVENZIONE

### ***HEALTH STATUS AND THE MOST ECONOMICALLY IMPORTANT PATHOLOGIES OF THE MARINE FISH CULTURED IN GREECE AND THE EASTERN AEGEAN SEA. TREATMENT AND PREVENTION***

P. Varvarigos

*Ichthyopathologist, Athens, Greece*

During the last decade there has been a rapid development of marine fish farming in the Eastern Mediterranean basin, comprising mainly Greece, the Turkish coasts of the Eastern Aegean Sea as well as Cyprus.

The main fish species grown are sea bass (*Dicentrarchus labrax*, family *Serranidae*) and sea bream (*Sparus auratus*, family *Sparidae*). Each accounts for about half of total output. Currently, there is a noticeable shift towards the cultivation of additional marine species, which command a higher price and may help to increase the marketing of all farmed fish products. Such new entrants in farming belong mainly to the family *Sparidae* (breams). They comprise sharp snout bream (*Puntazzo puntazzo*), white bream (*Diplodus sargus*), striped bream (*Lithognathus mormyrus*), red porgy (*Pagrus pagrus*, *Pagrus major*), dentex (*Dentex dentex*) as well as pandora (*Pagellus erythrinus*). Their contribution to the overall farmed output is still marginal, but is expected to increase in line with the accumulation of research and field experience.

Apart from the financial and marketing problems, the industry has to confront production challenges. These relate to stock management and welfare, application of new technologies, environment protection, fish nutrition, disease prevention and control (fish health management).

The species farmed in the eastern Mediterranean usually suffer from bacterial, viral and parasitic diseases caused often by poorly studied pathogens that are common across the warm Mediterranean waters. The severity of infection and hence mortality and associated treatment cost is usually fish size, farm site (and management) and water temperature (season) dependent. Nevertheless, despite the intensification of production, the prevailing damaging pathologies in the grow-out units are still surprisingly few. On the other hand, young fish in hatcheries suffer deformities in the development of their skeleton and fins, which are poorly understood as regards their etiology. Discarded, deformed fish sometimes comprise a serious cost element of hatchery production, which is usually not budgeted for in advance.

The most frequent, widespread, deadly and economically important bacterial fish pathogens are *Vibrio anguillarum* causing vibriosis to sea bass, and *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (*Pasteurella piscicida*) causing pasteurellosis (or pseudotuberculosis) to both sea bass and bream. Vibriosis is most common during spring and autumn, while pasteurellosis is diagnosed when seawater temperature raises above 20°C.

Among the viral diseases of prevalent economic importance viral encephalopathy and retinopathy (VER) or viral nervous necrosis (VNN) of sea bass (*Nodavirus*) causes excessive damage to all ages of bass. Although not widespread, when it strikes a particular

farm it can be disastrous. Late August and early September is the season when it is most often diagnosed. Seawater temperatures may be as high as 28°C then.

Parasitic diseases are usually not of critical economic importance with the exception of the myxosporidiosis of sharp snout bream caused by *Myxidium leei* which infects the liver, gall bladder and gastrointestinal tract. Losses are high and this endo-parasitosis alone hinders the expansion of sharp snout bream rearing.

Second in importance among the parasites ranks the isopod *Ceratothoa oestroides*, which usually infests sea bass and bream reared in net cages. The young ecto-parasites either roam on the skin and gills causing stress, necrosis and secondary bacterial infections, while the adults attach themselves in the buccal cavity. Apart from mortality to the young fry, they may provoke growth retardation and devalue the end product. Parasitism by isopods is most severe during the early summer months.

Diseases of infrequent occurrence and of doubtful economic bearing comprise bacterial septicemias caused by other vibrios, prevalent among which are strains of *Vibrio vulnificus*, and *Vibrio alginolyticus*. In addition, cytophaga like, filamentous bacteria usually induce gill and skin lesions to young fish subsequent to stress or handling trauma, commonly known as myxobacteriosis. *Aeromonas sp.* and *Pseudomonas sp.* are occasionally perplexed as a result of environmental stress, malnutrition and/or hardship of the growing fish and may cause systemic disease.

Lymphocystis of sea bream (*Iridovirus*), which affects young bream, is self-healing and despite its frequency and appalling clinical symptoms, its consequences are indirect, by weakening the fish and predisposing to other pathologies.

Ecto-parasites of unknown economic implications, but adversely affecting the growing populations, are the common metazoan flatworms of the class *Monogenea*. Of those, *Microcotyle sp.*, and *Furnestinia echeneis* are found on the gills of sea bream, *Diplectanum aequans* is the monogenetic trematode, which is found on the gills of sea bass, while *Lamellodiscus sp.* is found attached to the gills of sharp snout bream. They produce local inflammation, hyper-secretion of mucus and necrosis. In extreme cases, the gill epithelium is damaged and its functions impaired.

Still unquantified is the damage to health and growth of the protozoan endo-parasites, such as those belonging to the class *Myxosporaea* causing myxosporidiosis as well as those of the subclass *Coccidia* causing coccidiosis.

Among the Myxosporaea, *Myxobolus sp.* is common in the gut mucosa of bass and *Myxidium sp.* infects the liver, gall bladder and gastrointestinal tract of sea bream, bass and sharp snout bream. *Ceratomyxa sp.* is found in the liver, gall bladder and intestine of sea bass and bream, but with rather limited direct consequences, whereas *Sphaerospora sp.* is a common finding in the renal tubules of poorly growing and ulcerated sea bream.

Endo-parasitic protozoa of the subclass *Coccidia*, mainly those of the genus *Eimeria sp.* and *Goussia sp.*, are often found in the intestine of sea bass, but their bearing to fish health and growth is unknown.

Last, the, at least partly, nutrition related *Winter* (or Spring) *Syndrome* of sea bream seems to depend mainly on the feeding practices during the colder season of the year. It manifests itself infrequently in late February and March with variable losses among bream, usually larger than 50g. The exact etiology of this syndrome is still unclear. So far, it has not been diagnosed in association with any particular pathogen(s).

Treating infectious diseases, be they bacterial or parasitic; is not always feasible, or economically acceptable in practice, nor always environmentally compatible. For example, there are no suitable drugs against endo-parasites, whereas knowledge gaps exist in the environmental compatibility of most antiparasitic bath treatments (formalin baths,

antilouse baths). Licensed antibiotics against bacterial pathogens are only a few and are often used beyond acceptable measure.

Vaccines against common bacterial septicemias, such as vibriosis and pasteurellosis have been licensed. Vibriosis vaccines have proved effective in practice (RPS >80%), but protection against pasteurellosis conferred by the currently available vaccines is very limited (RPS <45%) and short-lived. Although vaccines would be the only means to prevent viral diseases, in particular VNN, research, usually by multinational pharmaceutical companies, has not yet provided an answer.

Management measures, such as regular disinfection, cage-net washing, avoiding fish overcrowding and over-feeding, combined with deep waters with sufficient currents have proved invaluable to many farms. Further, in the lack of enough research to tackle the practical needs, local experience is gained often by trial and error.

## **PATOLOGIE DELLE SPECIE ITTICHE MEDITERRANEE: PROBLEMATICHE, RICERCHE E PROSPETTIVE**

### ***DISEASES OF MEDITERRANEAN FISH SPECIES: PROBLEMS, RESEARCH AND PROSPECTS***

A. Colorni

*Israel Oceanographic and Limnological Research, National Center for Mariculture, Eilat, Israel*

Seabream *Sparus aurata* and seabass *Dicentrarchus labrax* still dominate the production of the Mediterranean fish farming industry, but new species, Mediterranean and otherwise, are being constantly added to the list. Significant progress has been made in the farming of Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) in Spain, Malta and Croatia. Health management in the domestication of new species remains a high priority, while knowledge gaps are gradually bridged. The major diseases which confront farmers vary in prevalence according to the geographic latitude of each country around the Mediterranean basin, while the methods by which the animals are cultured greatly influence type and severity of diseases. "Old" pathogens (Lymphocystis and encephalitis viruses, "*Pasteurella*" *piscicida*, *Vibrio* spp., *Amyloodinium ocellatum*) still cause serious economic losses, and once sporadic diseases (by *Mycobacterium marinum*, *Streptococcus iniae*, *Lactococcus garvieae*, *Enteromyxum* [formerly *Myxidium*] *leei*, *Kudoa* sp.) are emerging. Sophisticated biotechnologies have been or are being developed and many microbial pathogens are identified today on a molecular basis. A PCR direct method for detection and identification of *M. marinum* based on the 16S rRNA gene sequence was successfully developed ten years ago in Israel, and has become established for other bacterial fish pathogens. Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) and Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP), by using the entire DNA rather than gene sequences, have provided an even higher level of precision in genotyping. Disease diagnosis can thus be very rapid and accurate, and taxonomic positions assigned with much greater confidence. At the same time, however, higher precision has made the need for major taxonomic shifts and re-classifications more frequent. The advent of genetic engineering has provided the fish industry with recombinant vaccines, based on selected antigens. Unfortunately, immunocompetence in very young stages is virtually non-existent, the specific immune response in fish is generally slow to build up and characterized by a short memory. Circulating antibodies may not be protective, so that high levels of specific antibodies often do not correlate with resistance or disease status. These facts make the fish rely more heavily on the nonspecific immune system as the initial and primary defense against microbial invasion. Endogenous peptides with powerful antimicrobial properties (endobiotics) have been recently detected, purified and characterized in fish. Three members of a novel family of such endobiotics ("piscidins"), expressed in mast cells of various families of fish in the suborder Percoidei, display a broad antibacterial spectrum and are effective against protistan ectoparasites such as the dinoflagellate *Amyloodinium ocellatum* and the ciliate *Cryptocaryon irritans*. The factors affecting modulation of piscidins are being studied. Potentiating the natural, non-specific, non-adaptive defenses of the host will limit use and dependence on treatment drugs and chemicals (antibiotics in particular) and is the innovative strategic course that fish health research has taken in the past few years.