

Nefrocalcinosi in branzino (*Dicentrarchus labrax*, L. 1758): aspetti anatomoistopatologici

Nephrocalcinosis in seabass (Dicentrarchus labrax, L. 1758): anatomopathological findings

Paola Beraldo*, Marco Galeotti

Sezione di Biologia e Patologia Animale, Dipartimento di Scienze Animali, Università degli Studi di Udine,
Via delle Scienze, 206 – Udine

RIASSUNTO - La nefrocalcinosi è caratterizzata da depositi calcarei nei tubuli renali, costituiti da precipitati insolubili, contenenti principalmente calcio e magnesio. E' un fenomeno di tipo degenerativo ad andamento cronico, che di norma non provoca tassi elevati di mortalità nei pesci, nei quali può passare anche inosservato. L'etiologia sembra riconducibile a modificazioni dei parametri chimico-fisici dell'acqua e a fattori dietetici. La nefrocalcinosi è stata frequentemente descritta nei Salmonidi, mentre sporadiche sono state le segnalazioni in specie marine allevate. Il presente lavoro vuole descrivere il quadro anatomopatologico causato da eccessivo deposito di precipitati cristallini nei tessuti renali in branzino (*Dicentrarchus labrax*). A tal scopo sono stati utilizzati 2000 avannotti, aventi un peso medio iniziale pari a 2,4 g., i quali sono stati allevati in vasche di vetroresina, rifornite di acqua di pozzo con salinità 37‰, temperatura 19-19,5°C, pH 7,4 e CO₂ 13-15 mg/l. Il protocollo ha previsto 11 campionamenti, effettuati nell'arco di quasi due anni: 8 con frequenza mensile e altri 3 nell'arco di un anno (ogni quattro mesi). Ogni campione era costituito inizialmente da 80 soggetti (i primi 8 mesi), in seguito da 40, i quali, dopo l'esame autoptico, sono stati fissati con soluzione di Bouin a +4°C, e, in seguito, sottoposti a esame istologico. La valutazione istologica è stata eseguita su 250 soggetti, considerando differenti parametri riguardanti la morfologia del parenchima renale e la presenza di depositi minerali (DM), tramite un sistema parametrizzato a punteggio. La prevalenza della malattia è stata pari al 100% e i DM di grandi dimensioni, presenti negli ureteri, nei tubuli e dotti collettori, esercitavano un'azione ostruttiva e compressiva alla quale era in genere associato un quadro istopatologico simile a idronefrosi. La persistenza di DM ha causato quadri infiammatori cronici, caratterizzati da aree moderatamente estese di atrofia sclerotica del parenchima renale, con fibrosi interstiziale e infiltrato linfocitario.

SUMMARY - *Nephrocalcinosis is characterized by mineral deposits in renal tubules, mainly composed by insoluble precipitates of calcium and magnesium. This is a degenerative chronic process that doesn't elicit high level of mortality in fish and, sometime, it could go unobserved. The etiology seems to be correlated with water parameter alterations and nutritional factors. Nephrocalcinosis has been frequently described in Salmonid, while sporadically in marine reared fish. The aim of this work is to describe anatomopathological pattern in seabass (Dicentrarchus labrax) due to the excessive deposit of insoluble precipitates in kidney. 2000 seabass fry, having initial mean weight 2.4 g., were reared in fiberglass tanks, supplied with well salt water: salinity 37‰, temperature 19-19.5°C, pH 7.4 e CO₂ 13-15mg/l. During almost two year 11 samplings carried out: 8 monthly and other 3 during one year (every 4 months). Each sample was initially composed by 80 subjects (first 8 months) and than 40, and, after the necropsy, they were fixed in Bouin solution to +4°C and submitted to histological exam. The histological evaluation was carried on 250 subjects, considering different pointed parameters as kidney morphology and presence of mineral deposits (MD). The nephrocalcinosis prevalence was 100%. The large MD present in renal tubules, urinary and collector ducts exerted an obstructive and compressive action which was correlated to a histopathological feature hydronephrosis-like. The MD persistence induced a chronic inflammation, characterise by areas moderately wide of sclerotic atrophy of renal parenchyma with interstitial fibrosis and lymphocyte infiltrate.*

Key words: Nephrocalcinosis, Urolithiasis, Kidney, Mineral deposit, Calcium, Seabass, Carbon dioxide.

* Corresponding Author: c/o Università degli Studi di Udine, Dipartimento di Scienze Animali, Sezione di Biologia e Patologia Animale, Via delle Scienze, 206 – Udine; Tel. 0432-558591/90; Fax: 0432-558585; E-mail: paola.beraldo@uniud.it.

INTRODUZIONE

La nefrocalcinosi è un'alterazione renale che accompagna certe tubulonefrosi (malattie tubulo-interstiziali) (Marcato, 2002), le quali sono causate dall'accumulo negli epitelii tubulari, nelle membrane basali, nell'interstizio e/o nei lumi tubulari di precipitati insolubili, costituiti soprattutto da calcio e magnesio. Questo processo patologico di tipo degenerativo ad andamento cronico nei pesci, in genere, non comporta tassi elevati di mortalità e può passare del tutto inosservato (Herman, 1971).

In ambito ittiopatologico, quest'alterazione ha ormai assunto la prerogativa di vera malattia, dai connotati anatomopatologici ascrivibili, quindi, a nefrocalcinosi. La malattia, in quanto tale, è stata descritta per la prima volta da Keiz (1966) in trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*) e in seguito da Besse *et al.* (1968), i quali hanno utilizzato per primi il termine nefrocalcinosi, riferendosi a quadri di proliferazione cistica renale e urolitiasi. In seguito, diversi Autori hanno segnalato questa malattia in alcune specie ittiche di acqua dolce (Harrison & Richards, 1979; Schlotfeldt & Schoon, 1979; Schlotfeldt, 1980). In Italia Ghittino (1985) ha riscontrato la malattia in pesci allevati in acque di risorgiva, verosimilmente ricche di anidride carbonica.

I primi dati eziologici portarono a inquadrare quest'alterazione renale fra le malattie a matrice nutrizionale (Keiz, 1966; Ghittino, 1970; 1985; Richardson *et al.*, 1985), poiché un'elevata concentrazione di minerali nei mangimi per trote, in particolare di calcio e fosforo, è stata la prima causa associata alla malattia. In seguito, l'eziologia multifattoriale della nefrocalcinosi è apparsa sempre più evidente, riconducibile a fattori dietetici (carenza di magnesio, eccesso di calcio, ipervitaminosi D, eccesso di selenio), alla presenza di xenobiotici (metalli pesanti, farmaci o disinfettanti) ma, soprattutto, a concentrazioni elevate di CO₂ nell'acqua (> 10 mg/l) (Harrison, 1980; Hicks *et al.*, 1984; Fivelstad *et al.*, 1999).

Pur essendo stata molto spesso descritta nei pesci d'acqua dolce e in particolare nei Salmonidi (Besse *et al.*, 1968; Landolt, 1975; Cowey *et al.*, 1977; Smart *et al.*, 1979; Harrison, 1980; Schlotfeldt, 1980; Hicks *et al.*, 1984; Fivelstad *et al.*, 1999; Fivelstad *et al.*, 2003), la nefrocalcinosi è stata invece sporadicamente segnalata in specie marine allevate (Gomez, 2000; Lemariè *et al.*, 2000).

L'assenza in letteratura di dettagliate descrizioni anatomopatologiche sulla nefrocalcinosi in branzino (*Dicentrarchus labrax*) e la sua prevalenza elevata in particolari condizioni e siti d'allevamento, hanno suggerito di intraprendere quest'indagine. Lo scopo, quindi, di questo lavoro è stato di descrivere il quadro anatomopatologico in corso di nefrocalcinosi in branzino allevato.

MATERIALE E METODI

Per l'indagine sono stati utilizzati 2000 avannotti di branzino, aventi peso medio iniziale pari a 2,4 g., provenienti da una popolazione ottenuta tramite riproduzione artificiale. I soggetti sono stati allevati in vasche di vetroresina, rifornite di acqua di pozzo con salinità 37‰, temperatura 19-19,5°C, pH 7,4 e CO₂ 13-15 mg/l.

Il protocollo di campionamento prevedeva, nell'arco di quasi due anni, 11 prelievi: 8 a cadenza mensile (aprile-novembre) e altri 3 nell'anno successivo, distanziati tra loro di quattro mesi (marzo, luglio, dicembre). In corrispondenza dei primi 8 campionamenti sono stati prelevati 80 individui, soppressi con dose letale di anestetico (10 ml/l di fenossietanolo) e fissati *in toto* in liquido di Bouin a +4°C, previa apertura della cavità addominale. In seguito, all'aumentare della taglia dei pesci (ultimi tre campionamenti), il campione era costituito da 40 soggetti, dai quali, durante la necropsia, è stata asportata e fissata la parte

di colonna vertebrale con il rene anteriore e escretore *in situ*. L'isolamento del sistema renale *in toto* e la sua suddivisione nelle porzioni di rene anteriore e rene escretore sono state eseguite prima della fase di processazione. Le sezioni seriate di 5 µm sono state colorate con Ematossilina-Eosina, Rosso di alizarina S (McGee-Russell, 1958) e tricromica di Masson.

L'osservazione e la valutazione dei preparati istologici sono state rese oggettive individuando e punteggiando alcuni dei seguenti parametri:

- presenza di depositi minerali (DM), rilevando la distribuzione topografica nel rene anteriore, nelle diverse componenti del nefrone, negli ureteri e nel tessuto interstiziale;
- numerosità dei DM (assenti, bassa, moderata, elevata, molto elevata);
- dimensione dei DM espressa in µm:

dimensione	punteggio
<40	1
40-100	2
100-400	3
400-1000	4
>1000	5

- entità della dilatazione tubulare (assente, lieve, media, elevata, molto elevata);
- presenza di atrofia glomerulare (assente, lieve, media, elevata, molto elevata);
- presenza di fibrosi del parenchima renale (assente, appena percettibile, percettibile, ben evidente, diffusa);
- entità dell'infiltrato cellulare, rilevando la tipologia e la distribuzione topografica.

La valutazione istologica è stata integrata da altri rilievi istopatologici, quali la presenza di edema tubulare, fenomeni necrotici e presenza di granulomi.

Complessivamente sono stati processati e valutati i reni di 250 soggetti. L'osservazione e valutazione dei preparati istologici sono state eseguite sempre dalla medesima persona, al fine di ridurre la variabilità interpretativa dei preparati. La documentazione fotografica è stata prodotta tramite camera digitale.

La determinazione analitica della composizione chimica dei DM isolati dal tessuto renale è stata eseguita presso i laboratori della società SO.GE.SE s.a.s di Bari.

RISULTATI

L'esito della valutazione istopatologica ha rilevato una marcata variabilità individuale dei parametri scelti per descrivere lo stato di malattia, consentendo di rilevarne la presenza già dal primo campione. Tutti i soggetti esaminati presentavano, seppur di minima entità, alterazioni renali e depositi di sostanza minerale.

Valutazione anatomopatologica

Osservazioni macroscopiche

In sede autoptica, le lesioni a carico dell'apparato renale, riferibili a nefrocalinosi, erano manifeste solo nella forma di malattia tendenzialmente grave. In questi casi era possibile cogliere un aumento del volume del rene, che appariva di colore più chiaro rispetto alla norma e contraddistinto da aree e/o striature biancastre di aspetto gessoso (Figura 1). Nei casi più gravi, il rene era sensibilmente aumentato di volume per la presenza di grosse

concrezioni di colore biancastro, calcaree, di consistenza dura e stridente al taglio. Tali formazioni apparivano più abbondanti nella porzione distale del rene escretore e, l'osservazione al microscopio ottico di porzioni renali a fresco, rilevava la presenza di strutture di tipo cristalloide.

Nella forma lieve di malattia, le lesioni erano macroscopicamente inapparenti o era possibile repertare formazioni miliari di colore biancastro.

In generale, l'esame anatomopatologico non ha rilevato lesioni apprezzabili in altri compartimenti organici.

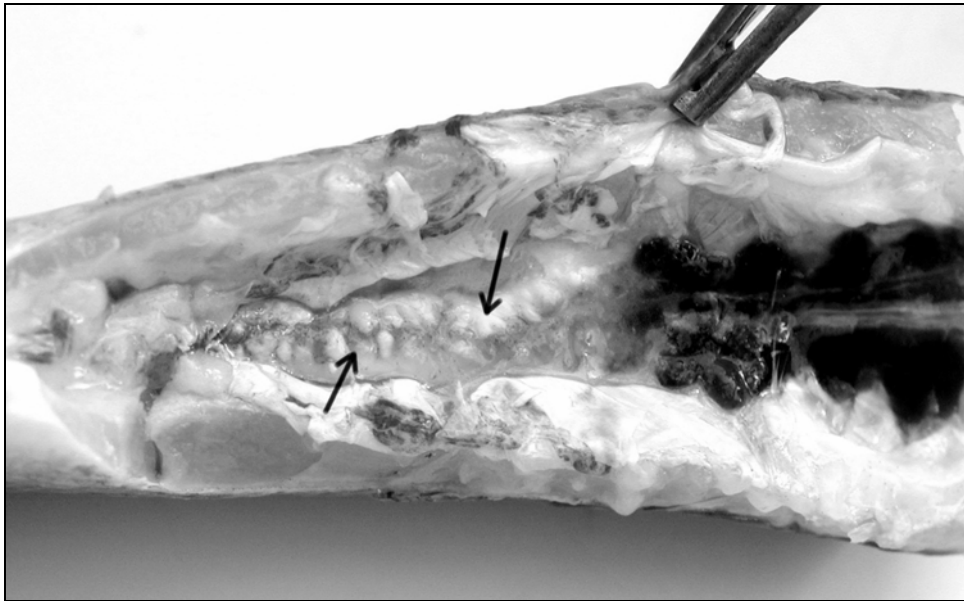


Figura 1- Rene escretore. Formazioni nodulari biancastre di aspetto gessoso nel terzo posteriore del rene escretore, riferibili a depositi di precipitati insolubili (freccia).

Figure 1- Kidney. Whitish chalky nodular formations in caudal portion of kidney, ascribable to the insoluble precipitate deposits (arrow).

Quadro istologico

In tutti i soggetti è stata riscontrata la presenza di DM di dimensioni variabili (40 μm -4000 μm) nei tubuli prossimali, nei tubuli e dotti collettori e negli ureteri. Talvolta sono state evidenziate delle concrezioni anche negli spazi interstiziali sia del rene anteriore, sia del medio-posteriore. I DM di grandi dimensioni, presenti soprattutto nel lume dei tubuli e dotti collettori e degli ureteri (Figura 2), esercitavano un'azione ostruttiva e compressiva alla quale generalmente era associato un quadro istopatologico simile all'idronefrosi.

Tale quadro era caratterizzato da una spiccata ectasia della maggior parte dei tubuli prossimali e da atrofia glomerulare con aumento dello spazio della capsula di Bowman. La persistenza dell'azione meccanica di tipo ostruttiva e/o compressiva da parte dei DM ha indotto aree moderatamente estese di sclerosi atrofica del parenchima renale accompagnata da fibrosi interstiziale e dalla presenza di abbondante infiltrato cellulare, costituito da linfociti, granulociti eosinofili e cellule granulari eosinofili (Figura 3).

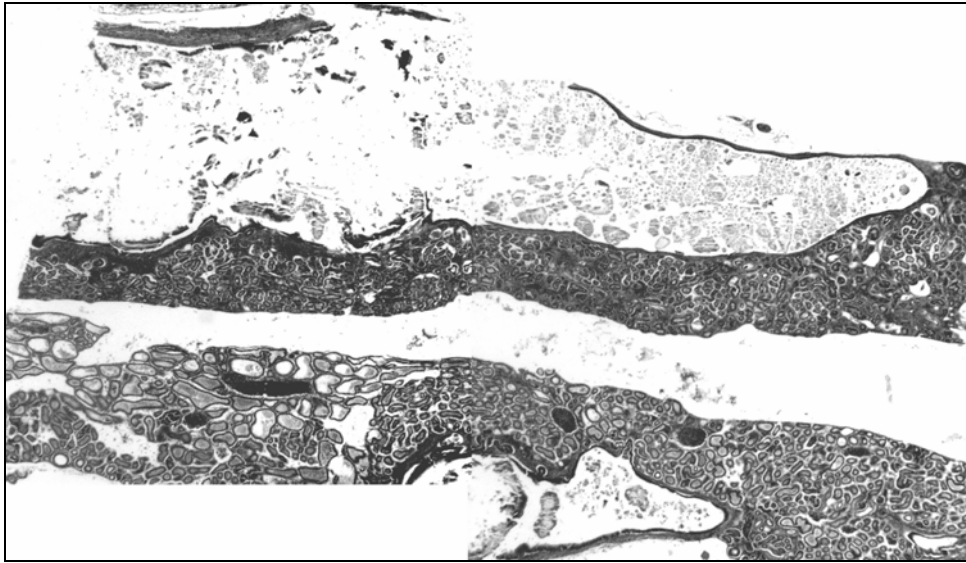


Figura 2 - Depositi di sostanza minerale di notevole entità in rene di branzino. EE, 100x.
Figure 2 - Large mineral deposits in seabass kidney. H-E, 100x.

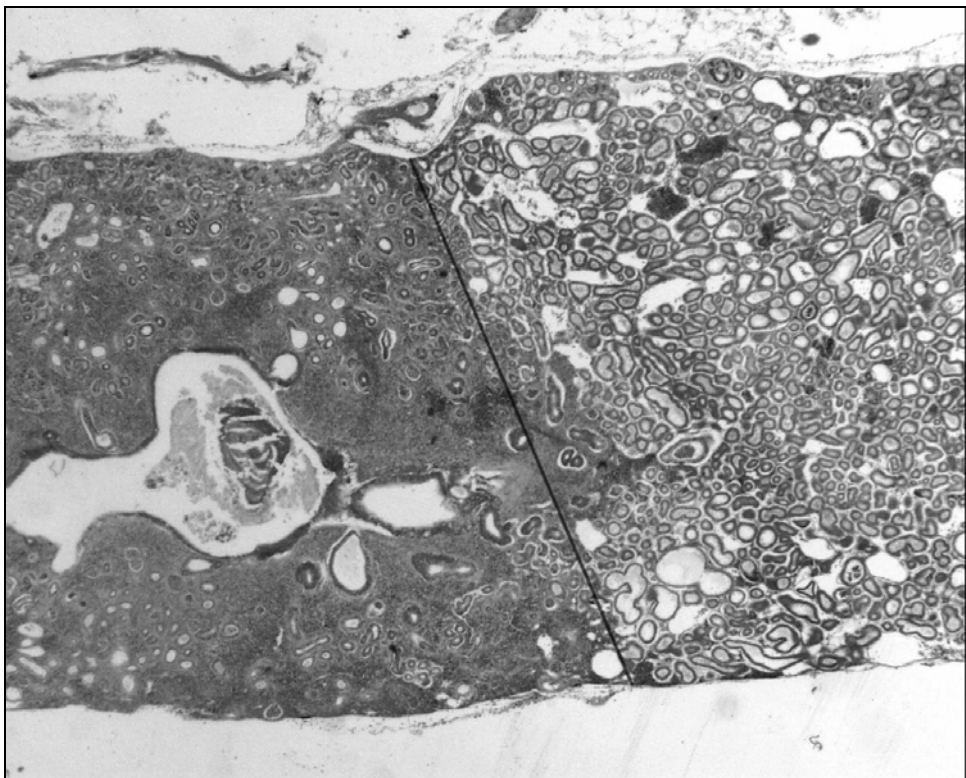


Figura 3 - La porzione di rene escretore a sinistra mostra un'estesa zona di atrofia del parenchima renale (linea di demarcazione) con la presenza di un apprezzabile deposito minerale. EE, 100x.
Figure 3 - Left portion of kidney show a large atrophic area in the renal parenchyma (boundary line) with a large mineral deposit. H-E, 100x.

I DM di piccole e medie dimensioni (40-400 μm) erano in genere osservati nel lume dei tubuli prossimali, i quali, sovente, erano interessati da processi infiammatori cronici, caratterizzati dalla comparsa di granulomi con centro necrotico costituito da calcio e detriti cellulari, abbondanti cellule infiammatorie (linfociti, macrofagi, granulociti eosinofili) e una modesta reazione fibroconnettivale.

Necrosi, rigonfiamento torbido, degenerazione vacuolare e a gocce ialine erano le alterazioni regressive regolarmente riscontrate a carico dell'epitelio dei tubuli prossimali (tubulonefrosi), esitando in atrofia tubulare. Piuttosto frequenti erano anche cilindri di materiale basofilo nei tubuli prossimali e collettori, riconducibili alla degenerazione cellulare e alla presenza di calcio non ancora mineralizzato (come suggerito dalle colorazioni istochimiche) e numerose *rodlet cells* disseminate nell'epitelio dei tubuli prossimali e dei tubuli collettori, le quali presentavano sovente nucleo picnotico o carioretico. Le alterazioni dei corpuscoli renali erano spesso riscontrate e contraddistinte dalla presenza di materiale eosinofilo di aspetto ialino nelle arteriole glomerulari con retrazione e coartazione della matassa capillare (atrofia del glomerulo arterioso) (Figura 4). Tali alterazioni, anche se non specifiche, erano riferibili a glomerulosclerosi. In alcuni casi si osservava ispessimento della capsula glomerulare e proliferazione delle cellule mesangiali (Figura 4).

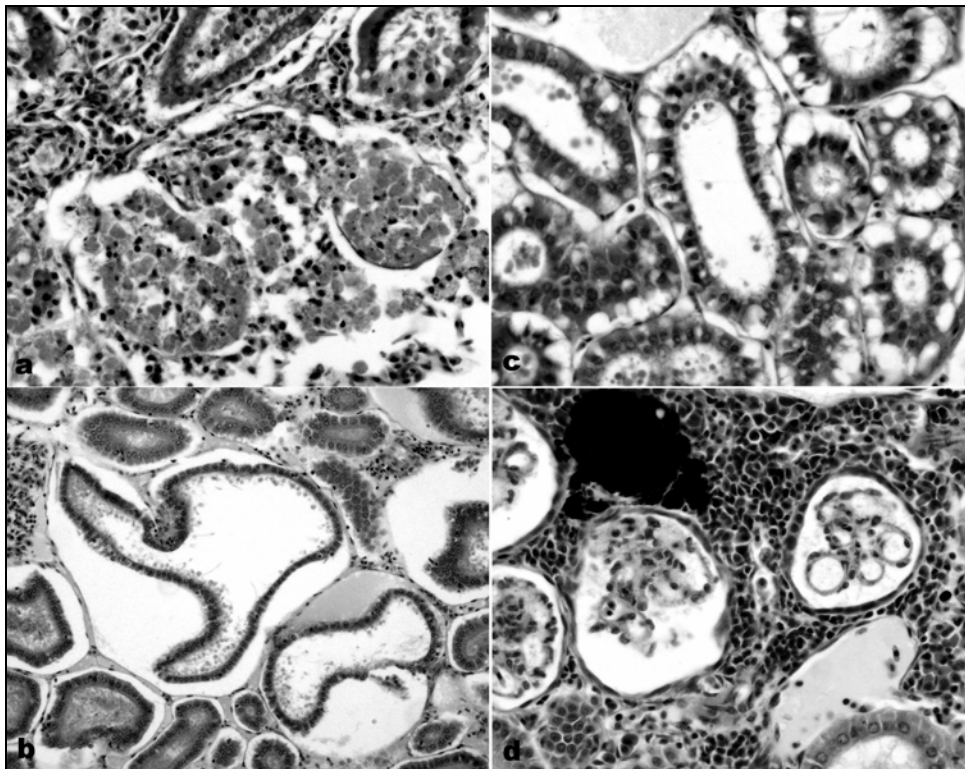


Figura 4 - a) - Necrosi dei tubuli prossimali; b) - degenerazione vacuolare; c) - edema e dilatazione cistica dei tubuli prossimali; d) - fibrosi e infiltrato pericorpuscolare, distorsione e dilatazione della capsula glomerulare. EE, 400x.

Figure 4 - a) - Necrosis of renal tubules; b) - vacuolar degeneration of tubular cell; c) - oedema and cystic dilatation of renal tubules; d) - fibrosis and infiltration around of renal corpuscle; distortion and dilatation of glomerular capsule. H-E. 400x.

Il parenchima renale appariva congesto, i vasi ematici ectasici e nel 20% dei soggetti si osservava emolisi con presenza di pigmenti porfirinici nel tessuto interstiziale, nei corpuscoli renali e nel lume dei tubuli (contribuiscono alla formazione di cilindri) e associato a necrosi delle cellule epiteliali (nefrosi); tali rilievi erano sovente accompagnati da presenza di globuli rossi nei tubuli renali.

Nel 70% dei soggetti prelevati durante l'inverno erano di comune riscontro fenomeni di tipo rigenerativo caratterizzati dalla presenza di gruppi di cellule basofile, con nucleo ipercromatico, leggermente appiattite, a ridosso dei tubuli collettori a formare tubuli con la tipica disposizione a S.

L'esame anatomopatologico non ha rilevato nei pesci esaminati lesioni in altri tessuti o organi o la presenza di agenti patogeni infettivi o lesioni ad essi riconducibili.

I precipitati insolubili erano composti prevalentemente da calcio, come svelato dalla colorazione Rosso di alizarina S e dall'analisi mineralogica dei calcoli estratti dal rene. L'esito di tale indagine ha identificato i depositi di sostanza minerale (calcoli) come bruscite o fosfato monoidrogeno calcico ($\text{CaHPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$).

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

L'indagine ha evidenziato che le peculiari condizioni d'allevamento, in associazione a concentrazioni medio/elevate di CO_2 (13-15 mg/l), è corrisposta una prevalenza del 100% della nefrocalcinosi. I primi soggetti esaminati presentavano già quadri istopatologici conclamati riferibili a nefrocalcinosi, pertanto, è logico dedurre che tale processo era iniziato prima, probabilmente durante le fasi larvale e post-larvale.

Nel lasso di tempo in cui sono state eseguite le osservazioni (18 mesi), i soggetti esaminati hanno mostrato segni di miglioramento durante il periodo invernale, confermato dalla presenza di aspetti rigenerativi del parenchima renale, mentre durante i mesi estivi, la malattia è sembrata peggiorare. Tale andamento potrebbe essere spiegato dall'aumento di CO_2 nei bacini di allevamento, in seguito all'adozione di regimi alimentari piuttosto spinti durante i mesi estivi e soprattutto, qualora la densità di allevamento sia eccessiva (70-90 kg/m^3).

L'analisi mineralogica ha identificato come bruscite il minerale accumulatosi nei reni e l'esame istochimico (Rosso di alizarina S) ha inoltre consentito di evidenziare la presenza di calcio nelle cellule epiteliali dei tubuli prossimali. L'accumulo di calcio intracellulare è infatti all'origine di modificazioni mitocondriali e altri segni di lesioni cellulare (accumulo di calcio nel citoplasma). I detriti cellulari e i precipitati insolubili, creano ostruzione dei lumi tubulari, inducendo così l'atrofia ostruttiva dei nefroni, in genere associata a fibrosi interstiziale e infiammazione cronica aspecifica, come descritto anche da Robbins & Cotran nell'uomo (1984).

La forma di malattia, esitata in un quadro anatomopatologico di media gravità, ha provocato un tasso di mortalità lieve (>2%) e ipofunzionalità renale cronica in grado di influenzare negativamente le prestazioni produttive e di ridurre le difese immunitarie (ipofunzionalità emo-linfopoietica). Gli Autori, infatti, hanno sovente riscontrato in campo una minore resistenza, associato a tassi di mortalità maggiori, in avannotti affetti da nefrocalcinosi cronica ad agenti infettivi rispetto a soggetti sani. In ogni caso, nei Teleostei molte delle funzioni escrettrici e osmoregolatrici proprie del rene dei vertebrati superiori, sono svolte da altri organi, quali le branchie e l'intestino. Tale condizione, infatti, consente ai pesci di patire meno affezioni renali anche di una certa gravità rispetto ai mammiferi (Ferguson, 1989).

Dal punto di vista eziopatogenetico, la precipitazione del calcio a livello renale è la conseguenza di stati ipercalcemici protratti, i quali possono essere indotti da: esagerato assorbimento di Ca per un eccessivo apporto dietetico, ipervitaminosi D, carenze di magnesio o elevato rapporto tra calcio e magnesio o fosforo e magnesio, abnorme mobilitazione di Ca dalle ossa, acidosi tubulare renale (squilibri nella regolazione acido-base dei fluidi corporei da eccessiva concentrazione di CO₂ nell'acqua), squilibri ormonali e tossicità da selenio o da trattamenti terapeutici.

In passato, l'eziologia dietetica della nefrocalcinosi nei pesci sembrava avere buoni fondamenti in letteratura (Cowey *et al.*, 1977; Knox *et al.*, 1981; Hilton & Hodson, 1983; Hicks *et al.*, 1984; Ghittino, 1985; Ferguson, 1989). Tuttavia le alterazioni delle caratteristiche chimiche dell'acqua sembrano svolgere un ruolo importante nell'esacerbare la malattia: concentrazioni eccessive di CO₂ sono state spesso correlate con un aumento dell'incidenza della nefrocalcinosi, soprattutto se associate a squilibri dietetici del rapporto Ca/P e Mg (Cowey *et al.*, 1977; Harrison, 1980; Hicks *et al.*, 1984; Fivelstad *et al.*, 1998; 1999; 2003).

In generale, elevate concentrazioni di CO₂, superiori a 15 mg/l nell'acqua, sono dannose per i pesci in quanto inibiscono il rilascio di CO₂ dal sangue attraverso le branchie. L'eccesso di tale molecola nel sangue abbassa il pH ematico, causando una riduzione dell'affinità dell'emoglobina per l'ossigeno e, quindi, l'effetto finale, è una riduzione dell'apporto di ossigeno ai tessuti. Per di più, la conseguente diminuzione del pH ematico può causare una riduzione del tasso di calcio legato e un aumento di quello ionizzato presente nel sangue. A livello dei tubuli prossimali, corrispondenti al tratto di nefrone deputato al riassorbimento del calcio ionizzato, si avrà così un eccessivo deposito di calcio intracellulare e la conseguente formazione di DM. I risultati dell'indagine confermano quanto detto, poiché la concentrazione della CO₂ nell'acqua era costantemente attorno a 13-15 mg/l, sufficiente per far riscontrare effetti subletali nel branzino.

Le dimensioni elevate di alcuni DM e i processi granulomatosi, in risposta alla presenza di calcio nel parenchima renale, possono esercitare una notevole azione ostruttiva e compressiva alterando la funzionalità del parenchima renale e degli organi associati. Infatti potrebbero verificarsi modificazioni regressive sia del tessuto emopoietico e linfoide (soprattutto quando coinvolto il rene anteriore) sia di alcuni organi endocrini, quali i corpuscoli di Stannius e il sistema renina-angiotensina (cellule del complesso iuxtaglomerulare). Questi organi endocrini sono coinvolti direttamente o indirettamente nell'omeostasi del calcio e potrebbero giocare quindi un ruolo fondamentale nella cronicizzazione della nefrocalcinosi. È noto che l'asportazione chirurgica dei corpuscoli di Stannius causa ipercalcemia, condizione che potrebbe essere riprodotta dall'atrofia, conseguente all'azione compressiva dei DM.

Una considerazione particolare meritano gli aspetti rigenerativi renali, osservati nei branzini prelevati durante l'inverno, contraddistinti dalla comparsa di gruppi di cellule basofile adiacenti ai dotti collettori a formare tubuli a forma di S. Tali aspetti sono interpretabili come fenomeni di nefroneogenesi. È risaputo infatti, che i pesci, dopo l'azione lesiva causata da *noxa* di diversa natura, esibiscono una considerevole risposta nefroneogenica. Tale rigenerazione, documentata anche in letteratura (Reimsschussel, 2001), consiste nella formazione di unità nefroniche *ex novo* che permette al pesce di recuperare una condizione renale di normalità. La capacità nefroneogenica evidenziata anche nel branzino è particolarmente palese quando la nefrocalcinosi, seppur grave, regredisce prontamente nei soggetti che ritrovano condizioni ottimali di allevamento come in mare.

Come già sottolineato, in ambito ittiopatologico, la nefrocalcinosi assume prerogative di vera malattia. In ogni modo, sulla base delle osservazioni prodotte in questo lavoro, il quadro anatomopatologico osservato nel branzino potrebbe essere più correttamente ascritto a

nefrolitiasi calcica, contraddistinta dalla presenza nel lume delle vie urinarie di formazioni solide definibili come calcoli, principalmente a base di calcio.

BIBLIOGRAFIA

- Besse P., De Kinkelin P. & Levaditi J.C. (1968). La néphrocalcinose de la truite arc-en-ciel (*Salmo irideus*, Gibbons, 1855). *Bull. Off. Int. Epiz.*, 69: 1391-1399.
- Cowey C.B., Knox D., Ardon J.W., George S. & Pirie B. (1977). The production of renal calcinosis by magnesium deficiency in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Brit. J. Nutrition*, 38: 127-135.
- Ferguson H.W. (1989). Systemic pathology of fish. *Iowa State University Press, Ames, Iowa*: 263.
- Fivelstad S., Haavik H., Løvrik G. & Olsen A.B. (1998). Sublethal effects and safe levels of carbon dioxide in seawater for Atlantic salmon postsmolts (*Salmo salar* L.): ion regulation and growth. *Aquaculture*, 160: 305-316.
- Fivelstad S., Olsen A.B., Åsgård T., Baeverfjord G., Rasmussen T., Vindheim T. & Stefansson S. (2003). Long-term sublethal effects of carbon dioxide on Atlantic salmon smolts (*Salmo salar* L.): ion regulation, haematology, element composition, nephrocalcinosis and growth parameters. *Aquaculture*, 215: 301-319.
- Fivelstad S., Olsen A.B., Kløften H., Ski H. & Stefansson S. (1999). Effects of carbon dioxide on Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts at constant pH in bicarbonate rich freshwater. *Aquaculture*, 178: 171-177.
- Ghittino P. (1970). Piscicoltura e Ittiopatologia. Vol. 2°, Ittiopatologia. *Ed. Riv. di Zootecnia, Milano*.
- Ghittino P. (1985). Tecnologia e patologia in acquacoltura. Vol. 2°, Patologia. *Tipografia Emilio Bono, Torino*.
- Gomez S. (2000). Nephrocalcinosis in mediterranean cultured white bream (*Diplodus sargus* L.). *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 20: 40-42.
- Harrison J.G. (1980). Nephrocalcinosis of rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) in freshwater; a survey of affected farms. *In: Fish Disease, 3° COMPRAQ-Sess., Ed. W. AHNE. New York*: 193-197.
- Harrison J.G. & Richards R.H. (1979). The pathology and histopathology of nephrocalcinosis in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson in fresh water. *J. Fish Dis.*, 2: 1-12.
- Herman R.L. (1971). Visceral granuloma and nephrocalcinosis. *Fisheries Disease Leaflet, 32, U.S. Fish and Wildlife Service, Washington, DC*.
- Hicks B.D., Hilton J.W. & Ferguson H.W. (1984). Influence of dietary selenium on the occurrence of nephrocalcinosis in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *J. Fish Dis.*, 7: 379-389.
- Hilton J.W. & Hodson P.V. (1983). Effect of increased dietary carbohydrate on selenium metabolism and toxicity in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. Nutrition*, 113: 1241-1248.
- Keiz G. (1966). Dommages causés à des élevages de truite par des mélanges d'aliments secs. *Bull. Off. Int. Epiz.*, 65, 7-8: 1119-1125.
- Knox D., Cowey C.B. & Adron J.W. (1981). Studies on the nutrition of salmonid fish. The magnesium requirements of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Brit. J. Nutrition*, 45: 137-148.

- Landolt M.L. (1975). Visceral granuloma and nephrocalcinosis of trout. *In: The Pathology of fishes*, Ed. W. R. Ribelin e G. Migaki. Wisconsin Press: 793-801.
- Lemarié G., Dutto G., Le Roux A., Lemoalle J., Maxime V. & Person-Le Ruyet J. (2000). Long-term effects of pH and carbon dioxide on growth and feed efficiency in European seabass. *Eur. Aquat. Soc., Special Publication* 28: 34.
- Marcato P.S. (2002). Patologia sistematica veterinaria. *Edagricole, Bologna*.
- McGee-Russel S.M. (1958). Histochemical methods for calcium. *J. Histochem. Cytochem.*, 6: 22.
- Reimsschussel R. (2001). A fish model of renal regeneration and development. *ILAR J.*, 42, 4: 285-291.
- Richardson N.L., Hicks D.A., Beames R.M. & McBride J.R. (1985). Influence of dietary calcium, phosphorus, zinc and sodium phytate level on cataract incidence, growth and histopathology in juvenile chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *J. Nutrition*, 115: 553-567.
- Robbins S.L. & Cotran R.S. (1984). Le basi patologiche delle malattie. *Piccin, Padova*.
- Schlotfeldt H.J. (1980). The increase of nephrocalcinosis in rainbow trout in intensive aquaculture. *In: Ahne W. (Eds.), Fish Diseases. Third COPRAQ Session. Springer-Verlag, Berlin*: 198-205.
- Schlotfeldt H.J. & Schoon H.A. (1979). Nierenverkg (NC, Nephrocalcinose oder Nephrokalzinose) der Regenbogenforelle in der Intensivaquakultur. 1. Klinischer Verlauf und Histopathologie. *Tierarztl. Praxis*, 7: 523-538.
- Smart G.R., Knox D., Harrison J.G., Ralph J.A., Richards R.H. & Cowey C.B. (1979). Nephrocalcinosis in rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson; the effect of exposure to elevated CO₂ concentrations. *J. Fish Dis.*, 2: 279-289.