

## CASO DI YERSINIOSI IN TROTE MARMORATE (*SALMO TRUTTA* SSP. *MARMORATUS*) SELVATICHE.

M. Prearo<sup>1</sup>, P. Gilli<sup>1</sup>, S. Cabra<sup>1</sup>, D. Prearo<sup>1</sup>, P. Pavan<sup>3</sup>, C. Ghittino<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Centro per lo Studio delle Malattie dei Pesci e Acquacoltura, Istituto Zooprofilattico Sperimentale, Via Bologna 148, 10154 Torino

<sup>2</sup> Centro di Ittiopatologia ed Acquacoltura, Istituto Zooprofilattico Sperimentale, Via Salvemini 1, 06126 Perugia

<sup>3</sup> ASR 11, Servizio Veterinario area A, Via Marconi 30, 13011 Borgosesia (VC)

La Bocca Rossa, sostenuta da *Yersinia ruckeri*, è una patologia frequente nella trota iridea d'allevamento, ma non è mai stata segnalata in Italia nella trota europea e nelle sue sottospecie.

Il caso qui descritto è stato riscontrato in riproduttori di trota marmorata (*Salmo trutta* ssp. *marmoratus*) selvatici, venuti a morte nel dicembre 2001 nel fiume Sesia.

L'esame anatomopatologico ha messo in evidenza lesioni emorragiche a carico della cavità boccale, petecchie sul fegato, grasso periviscerale, vescica natatoria ed enterite emorragica.

L'esame colturale, condotto su agar sangue, ha portato all'isolamento in purezza di colonie rotonde, bianco-grigiastre, non emolitiche, dopo 24 ore di incubazione a 22° C, che sono risultate negative al test dell'ossidasi; i ceppi isolati sono stati trapiantati su MacConkey agar, con crescita di colonie di caratteristico colore rosso.

L'identificazione orientativa è avvenuta con il test rapido di agglutinazione al lattice, impiegando anticorpi policlonali contro i sierotipi 1-2-3 di *Y. ruckeri*. L'identificazione definitiva è avvenuta con l'ausilio di test biochimici condotti su gallerie API 20 E.

Il ceppo è risultato analogo agli isolati di *Y. ruckeri* provenienti dai vari allevamenti di trota iridea italiani.

## PRIMO ISOLAMENTO DI *VIBRIO ANGUILLARUM* SIEROTIPO O1 DALLA SOGLIOLA COMUNE (*SOLEA SOLEA*, L.) IN ITALIA

A. Manfrin<sup>1</sup>, M. Doimi<sup>2</sup>, P. Antonetti<sup>3</sup>, L. Delgado Montero<sup>1</sup>, K. Qualtieri<sup>1</sup>, E. Rampazzo<sup>1</sup>, F. Mutinelli<sup>1</sup>, E. Melchiotti<sup>1</sup>, M.A. Bozza<sup>1</sup>, L. Selli<sup>1</sup>, G. Bovo<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie - Legnaro (PD)

<sup>2</sup>D. & D. Consulting - Quarto d'Altino (VE).

<sup>3</sup>AULSS n. 12 - Servizi Veterinari - Mercato Ittico di Venezia.

Durante gli ultimi anni, allo scopo di diversificare la propria produzione, alcune aziende produttrici di specie marine si sono orientate verso l'allevamento della sogliola comune (*Solea solea*, L.), animale di elevato valore commerciale. Nel settembre del 2001 un'azienda del Nord Adriatico ha catturato, nella laguna di Venezia, un gruppo di circa 3000 soggetti giovani (taglia media 2-3 cm) allo scopo di introdurlo nel proprio impianto intensivo per l'ingrasso. Sei mesi dopo, in corrispondenza con l'innalzamento della temperatura dell'acqua, si è verificato un episodio di mortalità elevata (circa 200 morti/die). Gli animali non avevano sintomi clinici caratteristici e sulla cute erano presenti delle aree di erosione e di depigmentazione circoscritte. Gli organi interni non presentavano lesioni macroscopiche o istopatologiche significative. Alcuni soggetti sono stati sottoposti con esito negativo agli esami parassitologico, virologico ed immunoistochimico per Nodaviriosi, mentre da tutti è stato isolato in purezza *Vibrio anguillarum* sierotipo O1 dal cervello. Dopo aver sottoposto il ceppo ad antibiogramma, secondo la tecnica della diffusione in agar (Kirby Bauer), gli animali sono stati trattati con antibiotico e la mortalità si è bloccata con completa guarigione dell'intero gruppo.

Pur essendo la Vibriosi una patologia conosciuta da anni ed esistendo alcune segnalazioni su focolai di malattia nei pesci piatti (sogliola atlantica, senegalense, rombo, passera, platessa) a livello internazionale, la nostra risulta essere la prima segnalazione di un episodio acuto riferibile ad infezione da *Vibrio anguillarum* sierotipo O1 nella sogliola comune (*Solea solea* L.) in Italia.

## SINDROME ULCERATIVA DA *VIBRIO VULNIFICUS* IN SPIGOLE (*DICENTRARCHUS LABRAX*) ALLEVATE IN GABBIA GALLEGGIANTE.

F. Marcer, M. Caffara, D. Florio, M.L. Fioravanti, F. Cardia\*

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

\*Libero professionista

Nell'ultimo decennio l'allevamento di specie ittiche marine in gabbia galleggiante è andato incontro ad un notevole sviluppo in tutto il bacino del Mediterraneo. Oltre al verificarsi di patologie infettive sostenute da agenti eziologici batterici e virali già segnalati in sistemi d'allevamento a terra, si sono cominciate ad osservare nuove patologie sostenute da microrganismi ubiquitari tipici degli ambienti marini costieri, quali in particolare alcune specie di Vibrionaceae. Nei paesi tropicali e sub-tropicali *Vibrio vulnificus* è stato ampiamente studiato in quanto frequente contaminante di prodotti ittici marini e potenziale agente di zoonosi. Viene qui descritto un caso di sindrome ulcerativa verificatosi nel febbraio 2002 in spigole (*Dicentrarchus labrax*) allevate in gabbie galleggianti in Italia centro-meridionale in cui è stato possibile isolare *Vibrio vulnificus* dalle lesioni cutanee. I soggetti erano stati di recente manipolati per operazioni di pesca e presentavano una mortalità moderata e continuativa. All'osservazione anatomopatologica in tutti i soggetti venivano evidenziate estese lesioni cutanee a carattere ulcerativo localizzate prevalentemente sui fianchi. Le ulcere apparivano circondate da un esteso alone iperemico ed erano spesso associate alla presenza di emorragie alla base delle pinne e nella regione ventrale del corpo. All'apertura della cavità addominale non si evidenziavano alterazioni anatomopatologiche significative a carico degli organi interni ad eccezione di un notevole pallore del fegato. Su tutti i soggetti è stato condotto esame parassitologico completo, che ha dato esito negativo. Dal rene, dal cervello e dalle lesioni cutanee è stata effettuata la semina su terreni di primo isolamento idonei per microrganismi marini. L'esame batteriologico condotto dagli organi interni ha dato sempre esito negativo, mentre dalle lesioni cutanee è stato possibile isolare in purezza un ceppo batterico che è stato identificato come *Vibrio vulnificus* sulla base di test biochimici condotti sia in sistemi miniaturizzati in galleria che in macrometodo. Le osservazioni condotte nel corso di questo episodio morboso hanno permesso di individuare in *V. vulnificus* un potenziale agente eziologico di malattia nelle spigole allevate in gabbia, come già riportato da numerosi Autori in areali marini del sud-est asiatico. La possibilità che questo patogeno, pur non realizzando infezioni sistemiche, possa essere in grado di determinare nei pesci gravi infezioni secondarie, lo rende un fattore di rischio sanitario da non sottovalutare nell'allevamento in gabbia. Bisognerà inoltre valutare in futuro la sua diffusione negli ambienti marini costieri nazionali maggiormente utilizzati per le attività di maricoltura in relazione al suo importante ruolo nel determinismo di patologia nell'uomo.

## STUDIO DEI SISTEMI DI CAPTAZIONE DEL FERRO IN GERMI DEL GENERE *VIBRIO*.

P.G. Tiscar, F. Fato, A. Ciarelli, F. Mosca

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

Il genere *Vibrio* comprende specie batteriche patogene sia per diversi organismi acquatici che per l'uomo e, data la loro ampia diffusione nell'elemento acquatico, lo studio di tali germi ritrova come punto di interesse le interazioni intercorrenti tra gli stessi e l'ambiente, inteso sia come elemento abiotico, ovvero l'acqua, sia come risorse biotiche quali le specie alieutiche o d'allevamento, oltre che l'uomo.

Il risultato di tali interazioni germi-ambiente può essere identificato nell'esito della competizione per micro e macronutrienti, tra cui è di primaria importanza l'elemento ferro.

Il lavoro condotto in questa sede verte sulla caratterizzazione di batteri del genere *Vibrio* isolati a partire da campioni ittici provenienti dal Medio Adriatico e successiva evidenziazione dei loro sistemi di captazione del ferro.

Da settanta campioni di prodotti ittici raccolti comprendenti alici, merluzzi, triglie, sogliole, sarde, gallinelle, gamberi, granchi, scampi, cicale, vongole e vongole veraci, sono stati isolati 64 stipiti batterici.

Gli isolati sono stati tipizzati biochimicamente, e 22 riconosciuti come batteri appartenenti al genere *Vibrio* (n°3 *V. cholerae*, n°9 *V. alginolyticus* e n°10 *V. parahaemolyticus*).

I *Vibrio* sono stati testati relativamente alla resistenza ad una gamma di antibiotici (Cefalotina, Cefuroxina, Clindamicina, Trimoxazolo, Eritromicina, Gentamicina, Oxacillina, Penicillina G, Ac. Nalidixico, Ampicillina, Ceftazidime, Nitrofurantoina, Norfloxacin e Polimixina B), ed al potere emolitico mediante test di Kanagawa effettuato su Wagatsuma agar.

Dei batteri in esame è stata inoltre valutata la capacità di produrre siderofori, composti a basso peso molecolare chelanti il ferro, in grado di rappresentare fattori di crescita, di germinazione o di virulenza dei germi.

La produzione di siderofori è stata evidenziata qualitativamente mediante crescita dei batteri su CAS agar, procedendo successivamente alla loro valutazione quantitativa mediante saggio spettrofotometrico.

Inoltre è stato di interesse lo studio dell'induzione trascrizionale delle proteine esterne di membrana regolate dal ferro, le Iron-Regulated Outer Membrane Proteins (IROMPs).

A tal fine si è provveduto a coltivare tre differenti ceppi batterici, appartenenti alle tre diverse specie di *Vibrio* spp., in terreni privati od arricchiti di ferro, rispettivamente mediante aggiunta al terreno base (MM9) di acido etilendiammino-di(*o*-idrossifenilacetico) e di cloruro ferrico.

Dopo estrazione delle proteine esterne di membrana e loro separazione in SDS-PAGE si è evidenziata nei ceppi cresciuti in condizioni di deprivazione di ferro la comparsa di bande ad un peso molecolare di 78 kDa per *V. parahaemolyticus*, di 77 kDa per *V. cholerae* e di 78 kDa per *V. alginolyticus*.

Gli studi condotti rappresentano, relativamente ai *Vibrio*, un possibile punto di partenza all'approccio sperimentale di tematiche inerenti le dinamiche di popolazione microbica, nonché la patogenesi di infezioni che possono incidere sulle produzioni ittiche, sulla salute dell'uomo o sui possibili rischi zoonosici derivati dai pesci d'acquario.

## PRINCIPALI PATOLOGIE BATTERICHE RISCONTRATE IN PESCI D'ACQUARIO NAZIONALI E D'IMPORTAZIONE.

L. Locatelli<sup>1</sup>, E. Pavoletti<sup>1</sup>, P. Moroni<sup>2</sup>, S. Cabra<sup>1</sup>, P. Gilli<sup>1</sup>, D. Prearo<sup>1</sup>, M. Prearo<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Centro per lo Studio delle Malattie dei Pesci e Acquacoltura, Istituto Zooprofilattico Sperimentale, Via Bologna 148, 10154 Torino

<sup>2</sup> Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Veterinaria, Sezione Malattie Infettive, Università di Milano, Via Celoria 10, 20133 Milano

L'acquariofilia rappresenta un settore in crescita caratterizzato da un mercato internazionale che coinvolge innumerevoli Paesi ed ogni anno si assiste ad un incremento del volume d'affari attorno a questo settore.

Al fine di avere maggiori informazioni ed ottenere un quadro più completo sui rischi sanitari connessi all'importazione di specie ittiche esotiche e all'allevamento di quelle ornamentali, è stato condotto uno studio preliminare sulla ricerca di patogeni di origine batterica causa di processi morbosi e mortalità nei suddetti animali. Nel periodo compreso tra gennaio 2001 e giugno 2002, è stata effettuata una serie di campionamenti in diversi centri d'importazione o allevamento del Nord Italia, esaminando specie sia marine che d'acqua dolce con evidenti problemi sanitari.

Nel complesso sono stati analizzati 371 soggetti; nella maggior parte dei casi gli esemplari sono stati inviati direttamente al laboratorio di Ittiopatologia di Torino; in altri casi invece, sono state recapitate al suddetto laboratorio piastre inoculate per l'identificazione batterica.

Tutti i pesci sono stati sottoposti ad esame parassitologico a fresco di cute e branchie, ad esame anatomopatologico e colturale tramite semina su terreni di primo isolamento. Dopo un periodo di incubazione di 24-72 ore a 22-25° C, le colonie batteriche eventualmente sviluppatasi sono state sottoposte a colorazione di Gram ed identificate con il sistema API. Le colonie presenti sulle piastre inviate al laboratorio, invece, sono state portate in purezza ed identificate con i metodi suddetti.

Gli esami condotti hanno rilevato la prevalenza di infezioni sostenute da batteri Gram negativi più in particolare si sono isolati *Aeromonas hydrophila*, *A. sobria*, *Pseudomonas* spp., *Vibrio alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. mimicus* e *Plesiomonas shigelloides*.

Nel nostro paese non esiste ad oggi una normativa in materia, ad eccezion fatta di due telegrammi del Ministero della Sanità del 1990 sul controllo di tifo e colera in acque ed animali provenienti da Asia ed America del sud; sembra perciò doveroso sottolineare l'importanza che queste patologie dovrebbero rivestire, in quanto alcune potenzialmente pericolose per la salute pubblica.

ISOLAMENTO DI *LACTOCOCCUS GARVIEAE* DA TROTA IRIDEA (*ONCORHYNCHUS MYKISS*) IN FASE DI PREMACELLAZIONE: RISULTATI PRELIMINARI E RISVOLTI DI SANITA' PUBBLICA.

A. Manfrin<sup>1</sup>, F. Franceschini<sup>2</sup>, K. Qualtieri<sup>1</sup>, E. Rampazzo<sup>1</sup>, M. Volpin<sup>1</sup>, L. Selli<sup>1</sup>, G. Bovo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Istituto Zooprofilattico delle Venezie - Legnaro (PD)

<sup>2</sup>AULSS n.9 Dipartimento Prevenzione - Servizi Veterinari - Treviso

L'infezione da *Lactococcus garvieae* nella trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*) risulta essere, ormai da diversi anni, uno dei maggiori problemi che affliggono la trota coltura intensiva in Italia. Comunemente definita "streptococcosi d'acqua calda", in quanto i focolai più gravi tendono a comparire quando la temperatura dell'acqua supera i 14-15°C, determina solitamente elevate mortalità nei soggetti adulti con ingenti perdite economiche. Da febbraio a giugno 2002 abbiamo analizzato 82 trote iridee, provenienti da 6 allevamenti diversi per un totale di 13 partite di animali giunti al termine del ciclo di ingrasso, prelevate nelle vasche di stabulazione (fase di premacellazione) annesse ad un macello ittico situato nell'AULSS 9 di Treviso. Sono stati prelevati animali che presentavano esoftalmo e iperpigmentazione cutanea dai quali, dopo l'esame anatomico patologico e parassitologico, è stato effettuato l'esame batteriologico da rene, fegato, milza e muscolo mediante semina in Agar Sangue (AS), Tryptone Soya Agar (TSA) e Heart Infusion Broth (HIB).

34 soggetti (41,46%) sono risultati positivi per *Lactococcus garvieae* e 24 di essi (32,92%) presentavano un quadro setticemico con presenza del patogeno anche a livello della muscolatura. Pur trattandosi di risultati preliminari, oltre ad avere un'ulteriore conferma di quanto sia diffuso *L. garvieae* nella trota iridea, l'aspetto importante è dato dalla elevata percentuale di positivi nella muscolatura. Secondo quanto riportato in letteratura, infatti, questa specie batterica può causare nell'uomo infezioni setticemiche e a carico del tratto urinario, soprattutto in soggetti immunocompromessi. Fortunatamente a tutt'oggi nessun caso clinico umano è stato mai associato alla manipolazione o al consumo di prodotti ittici, ma data la sua potenzialità zoonosica è senz'altro necessario continuare ed approfondire le indagini, oltre che sulla sua prevalenza a livello di muscolatura anche sulla sua patogenicità nei confronti dell'uomo e dei mammiferi a sangue caldo in genere.

## USO DELLA TECNICA DI IMMUNOPRECIPITAZIONE IN GEL DI AGAR NELLA DIAGNOSI DI LATTOCOCCOSI IN TROTA IRIDEA

M. Prearo<sup>1</sup>, S. Cabra<sup>1</sup>, P. Accornero<sup>1</sup>, M. Latini<sup>2</sup>, P. Gilli<sup>1</sup>, F. Agnietti<sup>2</sup>, C. Ghittino<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Centro per lo Studio delle Malattie dei Pesci e Acquacoltura, Istituto Zooprofilattico Sperimentale, Via Bologna 148, 10154 Torino

<sup>2</sup> Centro di Ittiopatologia ed Acquacoltura, Istituto Zooprofilattico Sperimentale, Via Salvemini 1, 06126 Perugia

La lattococcosi, sostenuta da *Lactococcus garvieae*, è una patologia ubiquitaria che interessa sia specie dulciacquicole che marine. Comparsa in Italia agli inizi degli anni '90, è oggi la principale causa di mortalità nelle trottocolture, con perdite che possono raggiungere il 50-70% dei soggetti di taglia commerciale.

Nel presente studio sono stati analizzati dal punto di vista sierologico ceppi italiani, spagnoli, francesi, greci ed israeliani. Per la diagnosi della lattococcosi si è applicata la tecnica di immunodiffusione in gel di agar (AGID), servendosi di anticorpi policlonali prodotti su conigli, fatti reagire con antigeni di *L. garvieae* da testare, su un supporto di agar gelificato. Gli anticorpi sono stati prodotti inoculando conigli con ceppi di referenza inattivati di tale cocco Gram positivo. La metodica di produzione anticorpale prevede un trattamento ogni 3 giorni per 10 volte consecutive con quantità crescenti di sospensione batterica inattivata. Successivamente si procede al prelievo degli anticorpi, previo salasso dei conigli e alla loro titolazione.

L'AGID consiste nel porre a contatto l'anticorpo policlonale prodotto dal ceppo di *L. garvieae* di riferimento (ITP 2001, isolato in Italia da trota iridea), con antigeni costituiti da ceppi provenienti da diversi paesi del Mediterraneo. La comparsa di bande di reazione, tipiche di questa metodica, si è osservata solo in presenza di ceppi batterici italiani, mentre per gli altri la risposta è stata negativa.

Con questa tecnica si sono potuti classificare tutti gli isolati italiani come appartenenti allo stesso sierotipo (denominato convenzionalmente sierotipo I).

## MICOBATTERIOSI ITTICHE: PATOLOGIE EMERGENTI E DOMINANTI IN PESCI ORNAMENTALI

M. Prearo<sup>1</sup>, B. Campo dall'Orto<sup>1</sup>, V. Penati<sup>3</sup>, E. Pavoletti<sup>1</sup>, L. Locatelli<sup>1</sup>, C. Panzieri<sup>2</sup>, C. Ghittino<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Centro per lo Studio delle Malattie dei Pesci e Acquacoltura, Istituto Zooprofilattico Sperimentale, Via Bologna 148, 10145 Torino - Italia

<sup>2</sup> Centro di Ittiopatologia ed Acquacoltura, Istituto Zooprofilattico Sperimentale, Via Salvemini 1, 06126 Perugia - Italia

<sup>3</sup> Azienda Ospedaliera Ospedale Niguarda-Cà Granda, Istituto Villa Marelli, viale Zara 81, 20159 Milano - Italia

Le Micobatteriosi o Tubercolosi ittiche rappresentano un complesso di malattie sistemiche ad andamento cronico, sostenute da batteri acido-alcool resistenti (BAAR) appartenenti al genere *Mycobacterium*, aventi diffusione cosmopolita. Tali germi colpiscono sia specie dulciacquicole che marine, sia di acque tropicali che temperate. Sebbene le segnalazioni più frequenti riguardino i pesci ornamentali, la Tubercolosi è stata riscontrata anche in alcuni pesci allevati per consumo alimentare, quali salmoni, branzini, ecc.; non si conoscono infatti specie refrattarie a questa infezione, naturale o sperimentale.

Questa patologia ha carattere enzootico, ma la presenza molto prolungata, grazie al decorso cronico, la rende la prima malattia batterica da escludere in pesci d'acquario, specie se debilitati per fattori stressanti.

In questo lavoro vengono riportati i risultati di un'indagine condotta nel periodo giugno 2001-luglio 2002, su 256 campioni di pesci ornamentali inviati in laboratorio a scopo diagnostico. Tali soggetti appartenenti a varie specie e di diversa provenienza geografica, sono stati recapitati da importatori, allevatori e privati.

L'esame batteriologico e le successive prove biochimiche hanno evidenziato la presenza di tre specie di Micobatteri: *M. fortuitum*, *M. chelonae* e *M. marinum* isolate sia da animali con noduli macroscopicamente evidenti o rilevabili solo istologicamente che da soggetti privi di lesioni.

L'alta prevalenza di tali patologie nei pesci ornamentali esaminati le rende a ragione malattie di primaria importanza, che rivestono un ruolo emergente nel quadro delle patologie ittiche, con risvolti non trascurabili per la salute pubblica.



## MICOBATTERIOSI IN PESCI ORNAMENTALI D'IMPORTAZIONE

D. Florio, P. Lo Zito, M.L. Fioravanti, M. Prearo\*, R.G. Zanoni

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

\*Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Piemonte, Liguria e Valle D'Aosta, Torino.

Nell'ambito di ricerche volte alla definizione dello stato sanitario dei pesci ornamentali si è ritenuto opportuno intraprendere un'indagine batteriologica volta a valutare la prevalenza dell'infezione da micobatteri in soggetti d'importazione. Questi microrganismi, oltre a determinare nei pesci patologie a decorso generalmente cronico, a carattere sistemico e granulomatoso, rappresentano agenti di zoonosi.

Da ottobre 2001 a luglio 2002 sono stati esaminati 340 pesci ornamentali appartenenti a 36 diverse specie, di cui 22 dulciacquicole (307 soggetti) e 14 marine (33 soggetti), provenienti da Singapore, Malesia, Sri Lanka, Indonesia, Brasile, Colombia, Hong Kong. Da ogni partita, al momento dell'arrivo, veniva prelevato casualmente un numero significativo di soggetti che veniva inviato direttamente al Laboratorio. Tutti i soggetti, indipendentemente dai dati anamnestici e clinici, venivano sottoposti ad un esame anatomopatologico e parassitologico a fresco. Particolare attenzione veniva riservata al rilevamento di formazioni granulomatose a carico degli organi interni. Milza, fegato e rene venivano prelevati in asepsi da tutti i soggetti, seminati su terreni selettivi per micobatteri quali Löwenstein-Jensen e MiddleBrook 7H10 ed incubati a  $25^{\circ}\text{C} \pm 1$  per un periodo minimo di 30 giorni. Tutti gli isolati sono stati sottoposti ad identificazione biochimica. Porzioni degli organi in cui si evidenziava la presenza di lesioni granulomatose venivano fissate in formalina tamponata al 10% e sottoposte ad esame istologico ricorrendo alle colorazioni di Ematossilina-Eosina e Ziehl-Neelsen. Dei 340 soggetti esaminati, 64 (18,8%) sono risultati positivi per micobatteri, con una prevalenza del 24,2% nei pesci marini e del 18,2% in quelli dulciacquicoli.

## SU DI UN CASO DI MICOBATTERIOSI UMANA DA *MYCOBACTERIUM CHELONAE*.

B. Campo dall'Orto<sup>1</sup>, V. Penati<sup>3</sup>, D. Florio<sup>2</sup>, E. Pavoletti<sup>1</sup>, R. Zanoni<sup>2</sup>, M. Prearo<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Centro per lo Studio delle Malattie dei Pesci e Acquacoltura, Istituto Zooprofilattico Sperimentale, Via Bologna 148, 10145 Torino

<sup>2</sup> Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale, Università di Bologna, Via Tolara di Sopra, 50, 40064 Ozzano Emilia (BO)

<sup>3</sup> Azienda Ospedaliera Ospedale Niguarda-Cà Granda, Istituto Villa Marelli, viale Zara 81, 20159 Milano

L'opinione diffusa della non trasmissibilità dei batteri acido-alcool resistenti tra i pesci e l'uomo è stata drasticamente smentita nel corso degli anni.

Con il termine di micobatteriosi atipiche si designano diverse patologie localizzate o sistemiche, ad andamento cronico, sostenute da germi appartenenti al genere *Mycobacterium*, ma non alla specie *tuberculosis* e *bovis*.

In particolare *M. marinum*, *M. fortuitum* e *M. chelonae* si sono più volte resi responsabili di episodi zoonosici: si tratta generalmente di una tipica malattia professionale, che si osserva tra gli operatori del settore ittico. Tali microrganismi possono infatti penetrare attraverso soluzioni di continuo ed abrasioni della cute, provocando come manifestazione clinica più comune, la formazione di granulomi o lesioni ipercheratotiche a carico delle estremità, che tendono a diffondere in senso ascendente, con linfadenite dell'arto corrispondente.

In questo lavoro viene descritto il caso di una paziente contagiata attraverso manipolazione del proprio acquario marino, in seguito risultato infetto da *Mycobacterium chelonae*. Alla donna, che presentava noduli cutanei su mani e avambraccio, inizialmente non era stata diagnosticata la natura tubercolare di tali lesioni. Data l'inefficacia della terapia adottata, venne eseguito un prelievo bioptico che mise in evidenza la presenza del suddetto micobatterio.

Dalle analisi effettuate su acqua, filtro e pesci dell'acquario, si è potuto isolare *M. chelonae* e quindi confermarli quali fattori di contagio.

## LA “WINTER SYNDROME” DELL’ORATA: RIFLESSI QUALITATIVI

M. Manera, P. Visciano, P. Losito, A. Ianieri

Dipartimento di Scienze degli Alimenti - Sezione di Ispezione degli Alimenti di Origine Animale - Università degli Studi di Teramo.

La “winter syndrome” o “winter disease” è una sindrome multifattoriale che colpisce le orate di allevamento in concomitanza di cali di temperatura dell’acqua ed è causa di significative perdite negli allevamenti nel bacino del Mediterraneo. L’eziopatogenesi, non ancora del tutto chiarita, ruota attorno ad uno squilibrio del metabolismo energetico, con particolare riguardo al metabolismo dei grassi, ad una immunodepressione e ad una alterata funzionalità, fluidità delle biomembrane alle basse temperature. Al fine di valutare, in via preliminare, le ricadute della sindrome in questione sulle caratteristiche nutrizionali del prodotto è stata predisposta la seguente indagine esplorativa. Un totale di 8 orate, di cui 4 affette da “winter syndrome” sono state campionate in un allevamento intensivo a terra. Ogni soggetto è stato misurato, pesato e sottoposto a necropsia completa, al termine della quale anche il fegato è stato pesato. A partire dai dati biometrici ottenuti è stato calcolato il *condition factor* [(peso/lunghezza standard<sup>3</sup>) x 100] e l’indice epatosomatico (peso epatico/peso corporeo x 100). Dalle branchie e dall’intestino sono stati ottenuti preparati a fresco per schiacciamento/raschiamento; dal fegato, rene e milza sono stati ottenuti strisci colorati con May-Grünwald Giemsa. I preparati così ottenuti sono stati osservati alla ricerca di lesioni ascrivibili a micro-parassiti od altri patogeni e, quelli di milza, rene e fegato, per la conta delle cellule granulari eosinofile (EGCs) per campo microscopico (obiettivo 20x) – 10 campi selezionati a caso per vetrino. La muscolatura laterale completa di ogni esemplare è stata isolata, omogeneizzata e sottoposta ad analisi della composizione centesimale secondo le seguenti metodiche: ISO/DP 6492 (grassi), CEE-ASP (proteine), A.O.A.C. 1975 (umidità), ISO-5984 (ceneri). Su parte dello stesso omogeneizzato è stata, inoltre, effettuata la determinazione del profilo acidico con tecnica gascromatografica previa estrazione dei lipidi e successiva metilazione degli acidi grassi. I dati biometrici, di composizione centesimale, acidica e numerici riferiti alle EGCs sono stati sottoposti ad analisi statistica (ANOVA) per la determinazione delle differenze significative. Le orate colpite da “winter syndrome” manifestavano esoftalmo, panoftalmia, opacità corneale e parziale ulcerazione corneale mono- o bilaterale. L’apparato gastroenterico era disteso da liquido citrino e materiale caseoso, poltaceo. Da un punto di vista biometrico le orate affette da “winter syndrome” hanno mostrato un peso (grammi; media ± errore standard; 203.48 ± 13.54 vs 307.50 ± 14.78; Anova, p < 0.01), un *condition factor* (2.27 ± 0.28 vs 3.11 ± 0.07; Anova, p < 0.01) inferiore ed un indice epatosomatico nettamente superiore (3.30 ± 0.35 vs 1.86 ± 0.11; Anova, p < 0.01) rispetto alle sane. Il numero di EGCs aumentava significativamente (Anova, p < 0.01) nei soggetti affetti da “winter syndrome” in modo particolare nella milza e nel fegato. In riferimento alla composizione centesimale le orate con “winter syndrome” hanno manifestato una umidità superiore rispetto alle sane (valori percentuali; 73.91 ± 0.32 vs 70.40 ± 0.80; Anova, p < 0.01). Per quanto attiene al profilo acidico i pesci affetti da “winter syndrome” hanno manifestato numerose differenze significative particolarmente a carico degli acidi grassi polinsaturi della serie n-3 (Anova, p < 0.05).

I risultati preliminari ottenuti mostrano come i pesci affetti da “winter syndrome”, manifestino un alterato metabolismo epatico dei grassi, in grado di ripercuotersi sulla qualità nutrizionale del prodotto ittico. L’aumentato numero di EGCs nei pesci colpiti, in considerazione del ruolo di queste cellule nella flogosi, pone, inoltre, una serie di interrogativi per le eventuali ricadute sul consumatore.

PARASITOLOGICAL MONITORING OF *PAPHIA AUREA* AND *P. AUREA* VAR. *BICOLOR* (VENERIDAE) FROM THE ST. GILLA LAGOON (CAGLIARI - ITALY).

V. Figus, J. Culurgioni, G. Canestri Trotti\*

Dip. Biologia Animale ed Ecologia - Università di Cagliari - Viale Poetto 1, Cagliari ([vfigus@vaxcal.unica.it](mailto:vfigus@vaxcal.unica.it))

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

The golden carpet shell *Paphia aurea* (Gmelin, 1790) and its conspecific *P. aurea* var. *bicolor* (Lamarck, 1818) live on sandy bottoms and burrow into soft substrates along the Italian coasts. The exploitation of their natural beds is due to massive catches occurred everywhere during the last years. Actually, even if in small quantities, they are still usually fished in shallow waters of St. Gilla lagoon. Since their parasitic fauna in this site has not previously been investigated, the aim of this first study was to verify the presence of potentially dangerous parasitic infections. Samples of *P. aurea* and *P. aurea* var. *bicolor* caught in St. Gilla lagoon, from September 2001 to June 2002, were examined for protozoan and metazoan parasites. Parasite prevalence and its 95% confidence interval, protozoan parasites mean density  $\pm$  SE (evaluated on the basis of mean number of parasites in 10 microscope fields at 400x per tissue sample), metazoan parasites mean intensity  $\pm$  SE and abundance  $\pm$  SE have been determined according to Bush *et al.* (1997). When *B. bacciger* was present its intensity was impossible to estimate, due to innumerable sporocysts and cercariae. (Table 1).

Out of the 104 examined *P. aurea*, 74 specimens (71.1%) proved infected by *Nematopsis* sp. (Apicomplexa, Porosporidae) oocysts, 81 (77.9%) by *Perkinsus* sp. (Dinoflagellata, Perkinsasidea) hypnospores, 24 (23.1%) by *Proctoeces maculatus* (Trematoda, Fellodistomidae) metacercariae, 16 (15.4%) by *Bacciger bacciger* (Trematoda, Fellodistomidae) sporocysts and cercariae, and 8 (7.7%) by *Paravortex* sp. (Turbellaria, Graffillidae).

Out of 20 examined *P. aurea* var. *bicolor*, 19 specimens (95.0%) proved infected by *Nematopsis* sp., 8 (40.0%) by *Perkinsus* sp., 6 (30.0%) by *B. bacciger* and 8 (30.0%) by *Paravortex* sp.

Between the two conspecific bivalves the prevalence of *Nematopsis* sp. ( $\chi^2= 3.89$ ), *Perkinsus* sp. ( $\chi^2= 10.08$ ), and *Paravortex* sp. ( $\chi^2= 6.25$ ) infections showed significant statistical differences while the prevalence of *B. bacciger* ( $\chi^2= 1.55$ ) is not statistically different. Concerning *P. maculatus* infection it is noticeable that, in our observations, all specimens of *P. aurea* var. *bicolor* examined proved negative.

Parasites	<i>P. aurea</i> :			<i>P. aurea</i> var. <i>bicolor</i>		
	P% (CI)	D (*MI) $\pm$ SE	A $\pm$ SE	P% (CI)	D (*MI) $\pm$ SE	A $\pm$ SE
<i>Nematopsis</i> sp.	71.2 (61.4-79.5)	20.3 $\pm$ 2.5	14.4 $\pm$ 2.0	95.0 (75.8-100)	21.8 $\pm$ 5.3	20.7 $\pm$ 5.1
<i>Perkinsus</i> sp.	77.9 (68.6-85.3)	7.9 $\pm$ 1.2	6.1 $\pm$ 1.0	40.0 (19.6-63.2)	32.1 $\pm$ 16.8	12.8 $\pm$ 7.4
<i>P. maculatus</i> *	23.1 (15.5-32.4)	4.6 $\pm$ 1.0	1.1 $\pm$ 0.3	0.0	0.0	0.0
<i>B. bacciger</i> *	15.4 (9.1-23.9)	N. E.	N. E.	30.0 (12.1-53.6)	N. E.	N. E.
<i>Paravortex</i> sp.*	7.7 (3.3-14.8)	4.0 $\pm$ 1.2	0.3 $\pm$ 0.1	30.0 (12.1-53.6)	1.3 $\pm$ 0.2	0.4 $\pm$ 0.1

Table 1 – Parasitic infections in *P. aurea* and in *P. aurea* var. *bicolor* from St. Gilla lagoon.  
N. E. = not estimated.

*MYTILICOLA INTESTINALIS* IN MITILI (*MYTILUS GALLOPROVINCIALIS*) PRESENTI IN BANCHI NATURALI DELLA LAGUNA DI MARANO (NORD ADRIATICO - ITALIA)

G. Ceschia<sup>1</sup>, D. Suman<sup>1</sup>, M. Zambon<sup>1</sup>, M. Sello<sup>1</sup>, Zentilin A.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Area Ittiopatologia, Laboratorio Patologia Molluschi, Via della Roggia 102, 33030 Basaldella di Campofornido (UD).

<sup>2</sup> ALMAR scarl, Via G. Raddi 2, 22050 Marano Lagunare (UD)

Lo scopo della presente ricerca era di osservare la presenza di *Mytilicola* (stadio parassitario) in mitili presenti naturalmente nella Laguna di Marano. *Mytilicola intestinalis* è un artropode appartenente alla Sottoclasse Copepoda, famiglia Mytilicolidae descritto per la prima volta da Steuer nel 1902 in mitili (*Mytilus galloprovincialis*) raccolti nel Golfo di Trieste. Successivamente è stato segnalato in altri molluschi bivalvi quali ostrica piatta, mitilo (compreso *M. edulis*), vongola e cuore (*Cardium* spp.).

La ricerca è stata effettuata dal mese di febbraio al mese di dicembre 1999. I campioni sono stati raccolti dal fondale o da bricole di 7 siti della Laguna di Marano (Porto Buso, Porto S. Andrea, Porto Lignano, località Tappo, Bocca Tre Canali, Punta Meso, località Marano). La ricerca di *Mytilicola* è stata eseguita tramite esame autoptico (21 campioni, 1062 soggetti) allo stereomicroscopio (osservazione dell'intestino con conteggio dei parassiti adulti repertati e delle femmine ovigere) ed esame istologico (colorazione Ematossilina-Eosina) (6 campioni, 450 soggetti).

Dagli esami effettuati sui campioni prelevati nella Laguna di Marano si osservava una maggiore presenza di *Mytilicola intestinalis* se riferita a quanto riscontrato in mitili allevati nella Regione Friuli-Venezia Giulia. Nel 1999 il grado di infestazione medio, rilevato all'esame autoptico, nelle mitilocolture triestine è stato del 0,63% (0,40% Baia di Panzano, 0,0% costiera Grignano-Aurisina, 1,48% Muggia). Nella ricerca gli stadi adulti di *Mytilicola intestinalis* rilevati sono stati reperiti nell'intestino.

L'esame autoptico ha evidenziato una percentuale d'infestazione che varia dal 10% (località Marano 15.09.99, Porto S. Andrea 04.08.99) al 76% (Porto S. Andrea 21.10.99). Il numero di parassiti/mitilo, nei soggetti positivi, varia da 1 a 14 (località Tappo 07.05.99); con un'intensità da 1 a 4,24 (località Marano 18.05.99) ed un'abbondanza da 0,1 a 2,57 (località Marano 21.07.99). Non è stato possibile rilevare una differenziazione significativa tra soggetti prelevati dal fondale o da bricole. La percentuale di presenza di femmine ovigere (Tab. 3) varia dal 41,4% Porto S. Andrea 19.08.99) all'80% (località Marano 15.09.99 e Porto S. Andrea 4.08.99). Il valore medio, calcolato sui 21 campioni, è del 55,92%.

L'esame istologico, condotto solamente su 6 campioni, presentava una percentuale d'infestazione più contenuta da quella riscontrata dall'esame autoptico (come era logico attendersi, dato anche la causalità della sezione effettuata dell'intestino): dal 5% (Bocca Tre Canali 25.02.99) al 33% (Porto S. Andrea 24.03.99).

L'esame autoptico ha permesso di rilevare che tutti i mitili esaminati erano vivi e non evidenziavano segni di deperimento. L'esame istologico, nei casi positivi, non ha evidenziato alterazioni ad organi o tessuti. Si è osservato, talvolta, che la sezione del lume intestinale appariva più allargata del normale, senza danni significativi alle cellule epiteliali.

## CONTRIBUTO ALLA CONOSCENZA DEI METAZOI PARASSITI DELLA CERNIA DI SCOGLIO (*EPINEPHELUS MARGINATUS* LOWE, 1834) DEL MEDITERRANEO.

E. Azzurro, F. Berrilli, C. De Liberato, D. Di Cave, P. Orecchia

Dipartimento di Sanità Pubblica e Biologia Cellulare, Università di Roma "Tor Vergata";

La cernia di scoglio (*Epinephelus marginatus* Lowe, 1834) è un teleosteo ad alta valenza ambientale ed economica per il quale è stata recentemente messa a punto una tecnica di riproduzione controllata finalizzata ad interventi di restocking e alla diversificazione delle produzioni dell'acquacoltura mediterranea.

A fronte delle necessità di informazioni sulla parassitofauna di questa specie, finalizzata ad agevolare il monitoraggio dei broodstock e degli esemplari allevati, viene proposta una sintesi delle conoscenze attualmente disponibili. Specifiche indicazioni vengono fornite sulle caratteristiche morfologiche dei parassiti, sulla loro localizzazione e sulla biologia, al fine di agevolare l'identificazione e valutare la patogenicità dei diversi taxa. Una particolare attenzione viene inoltre rivolta a quei parassiti che rappresentano un rischio potenziale per l'ospite, connesso con il suo trasferimento in ambiente controllato.

I dati si riferiscono a un'indagine parassitologica, tuttora in corso, condotta su un numero complessivo di 29 esemplari selvatici di peso variabile tra i 3 ed i 26 kg, catturati nelle acque circostanti le isole Pelagie e l'isola di Ustica.

Lo studio morfologico e morfometrico ha permesso la identificazione dei seguenti metazoi parassiti: **Monogenea:** *Cycloplectanum echinophallus*, *Cycloplectanum beverleyburtonae*, *Cycloplectanum riouxi*, *Megalocotyle hexacantha.*, **Digenea:** *Gonapodasmius* sp., *Proisorhynchus caudovatus*, *Helicometra fasciata*, *Podocotyle temensis*, *Lecithochirium* sp. **Cestoda:** *Grillotia epinepheli*. **Nematoda:** *Philometra* sp. **Copepoda:** *Hatschekia* sp. **Isopoda:** forme larvali (Pranize), cimotoidi.

Tale studio è stato condotto nell'ambito del progetto: "Parassiti e parassitosi di specie ittiche allevate. Problemi emergenti dell'acquacoltura nazionale" (V Piano Triennale della Pesca e dell'Acquacoltura), finanziato dal Ministero delle Politiche Agricole e Forestali.

## RICERCA DI *TETRACAPSULA BRYOSALMONAE* (MYXOZOA, SACCOSPORIDAE) IN TROTTICOLTURE NAZIONALI.

A. Gustinelli, M. Caffara, M. Prearo<sup>1</sup>, M.I. Taticchi<sup>2</sup>, M.L. Fioravanti

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

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Piemonte, Liguria e Valle D'Aosta, Torino.

<sup>2</sup> Dipartimento di Biologia Animale ed Ecologia, Università di Perugia.

La Malattia Proliferativa Renale o Proliferative Kidney Disease (PKD) è considerata la più importante malattia parassitaria dei Salmonidi allevati nel nostro Paese. Recentemente l'agente eziologico di questa patologia è stato identificato come *Tetracapsula bryosalmonae*, parassita appartenente al phylum Myxozoa ed ascritto alla nuova classe Malacosporea, ordine Malacovalvulida, famiglia Saccosporidae. Gli ospiti naturali del parassita sono stati individuati nei briozoi, invertebrati acquatici sessili a diffusione cosmopolita. Al fine di approfondire le conoscenze sull'epidemiologia della PKD in Italia, con questo lavoro si è voluto ricercare la presenza di *T. bryosalmonae* nelle trote iridee provenienti da allevamenti intensivi e nei briozoi reperiti nei corsi d'acqua limitrofi. Nel periodo 2000-2002 sono stati esaminati 304 soggetti di trota iridea provenienti da 14 allevamenti intensivi, tutti ubicati in Italia settentrionale ad eccezione di una trotticoltura in Italia centrale. Nello stesso arco di tempo sono state campionate colonie di briozoi da fiumi e canali connessi agli allevamenti presi in considerazione. Nelle trote la ricerca del parassita è stata effettuata mediante: esame microscopico di impronte di rene e milza colorate con May-Grünwald Giemsa, esame istologico con colorazione di Ematossilina Eosina e Giemsa, Polymerase Chain Reaction (PCR). Per quanto riguarda i briozoi sono stati effettuati sia esami microscopici a fresco che PCR. Delle 304 trote esaminate, 172 (56,6%) sono risultate positive per *T. bryosalmonae*. Gli stadi extrasporogonici sono stati evidenziati mediante esame microscopico ed istologico nel periodo Luglio-Ottobre, mentre è stato possibile rilevare l'infezione solo mediante PCR durante le fasi più precoci dell'infezione (Maggio-Giugno) e nei mesi invernali. La prevalenza della parassitosi ha presentato valori tra il 28,6 ed il 100% in 9 dei 14 allevamenti, mentre 5 allevamenti, siti in provincia di Terni, Sondrio, Torino ed Udine, sono risultati negativi. Per quanto concerne i briozoi è stato possibile campionare una notevole quantità di colonie in tutti i fiumi monitorati, senza mai riscontrare la presenza di *T. bryosalmonae*. Sono state individuate 8 specie: *Cristatella mucedo*, *Fredericella sultana*, *Hyalinella punctata*, *Plumatella casmiana*, *P. emarginata*, *P. fruticosa*, *P. fungosa* e *P. repens*. I risultati di questa ricerca hanno permesso di puntualizzare l'ampia diffusione di diverse specie di briozoi in tutti gli allevamenti di trote e nei relativi fiumi. L'assenza di *T. bryosalmonae* nei briozoi esaminati potrebbe essere spiegata con la bassa ed incostante prevalenza del parassita già descritta in questi invertebrati in altri Paesi. Ulteriori ricerche sono quindi necessarie per chiarire il ruolo dei briozoi nell'epidemiologia della PKD nel nostro Paese in modo da realizzare efficaci misure profilattiche nei confronti di *T. bryosalmonae*.

*SPHAEROSPORA TESTICULARIS* (MYXOZOA, SPHAEROSPORIDAE) IN SPIGOLE (*DICENTRARCHUS LABRAX*) ALLEVATE NEL MAR ADRIATICO.

M.L. Fioravanti, M. Caffara, D. Florio, F. Marcer, F. Quaglio, S. Colaç\*

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

\*Libera Professionista

Le sferosporosi della spigola (*Dicentrarchus labrax*) sono malattie parassitarie sostenute da mixosporidi appartenenti a due diverse specie, *Sphaerospora dicentrarchi* e *S. testicularis*. *S. dicentrarchi* è stata ampiamente descritta in spigole selvatiche ed allevate in tutto il bacino del Mediterraneo, mentre *S. testicularis* è stata fino ad oggi segnalata solo in spigole del bacino occidentale del Mediterraneo (Spagna). Viene qui descritto un caso di infezione gonadica da *S. testicularis* osservato nel periodo estivo in spigole di circa 250-300 g di peso allevate in gabbie galleggianti ubicate lungo la costa della Croazia. All'apertura della cavità corporea le gonadi si presentavano diminuite di volume e di colore bruno non uniforme, talvolta con presenza di noduli giallastri. L'esame microscopico a fresco metteva in evidenza la presenza di spore subsferiche con diametro di circa 15 µm e dotate di due capsule polari sferiche simmetriche di circa 3,5 µm di diametro. La superficie delle valve appariva liscia e la linea di sutura si presentava leggermente in rilievo. Spore con identiche caratteristiche venivano reperite in scarso numero anche a livello della mucosa intestinale di alcuni soggetti. I caratteri morfologici delle spore, la loro localizzazione e la tipologia di ospite hanno permesso di identificarle come *Sphaerospora testicularis* (Myxozoa, Sphaerosporidae). Vengono riportate le osservazioni morfologiche condotte su preparati a fresco e su impronte di organo colorate con May-Grünwald Giemsa. Il riscontro di questo mixosporidio in spigole allevate nel mar Adriatico indica la crescente diffusione di questi agenti parassitari nelle popolazioni ittiche marine d'allevamento. Ulteriori indagini andranno condotte su soggetti di spigola prelevati durante il periodo riproduttivo per valutare l'impatto dell'infezione sulla funzionalità gonadica. La mancanza di conoscenze sul ciclo biologico delle specie di *Sphaerospora* descritte nella spigola non permette al momento l'elaborazione di studi epidemiologici che possano essere utili alla prevenzione ed al controllo delle infezioni da esse sostenute.



## OSSERVAZIONI SU UN EPISODIO DI INFEZIONE MUSCOLARE DA *MYXOBOLUS* SP. (MYXOZOA, MYXOBOLIDAE) IN PESCI ROSSI AUTOCTONI

M. Caffara, F. Marcer, M.L. Fioravanti, D. Florio, F. Quaglio<sup>1</sup>, G. Cattabriga<sup>2</sup>

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

<sup>1</sup>Dipartimento di Zootecnica, Università di Bologna

<sup>2</sup> Libero Professionista

Nel pesce rosso (*Carassius auratus*) sono state descritte oltre 20 specie di *Myxobolus* (Myxozoa, Myxobolidae), di cui solo poche a localizzazione muscolare (*M. pfeifferi*, *M. muscoli*, *M. divergens carassii* e *M. kubanicum*). In questo lavoro viene descritto un caso di grave infezione del tessuto muscolare sostenuta da *Myxobolus* sp. (Myxozoa, Myxobolidae) in pesci rossi allevati in provincia di Bologna. In alcuni soggetti di pesce rosso si è manifestata nel periodo primaverile la comparsa di neoformazioni ellissoidali rilevate e simmetriche di circa 2 cm di lunghezza e 1 cm di diametro, localizzate sul dorso in posizione caudale rispetto alla porzione cefalica. Alla necropsia si è proceduto all'incisione della porzione muscolare interessata, evidenziando una massa di colore bianco madreperlaceo dalla quale l'epidermide si distaccava con facilità. Porzioni di muscolo sono state esaminate a fresco e dopo colorazione con May-Grünwald Giemsa. L'osservazione microscopica dei preparati ha permesso di evidenziare un elevato numero di spore di forma ellissoidale con due capsule polari simmetriche separate da un cospicuo processo intercapsulare e con lo sporoplasma localizzato nella porzione posteriore della spora. Le spore presentavano le seguenti dimensioni: lunghezza 10,5 µm (9-11; D.S. 0,525), larghezza 6,6 µm (6-7; D.S. 0,357), spessore 3,9 µm (3-5; D.S. 0,736). Le capsule polari apparivano piriformi ed appiattite anteriormente, poste ad una distanza di 1,5-2 µm l'una dall'altra e localizzate nella porzione anteriore della spora. Il filamento polare presentava 4-5 giri di spira. Le dimensioni delle capsule polari erano le seguenti: lunghezza 3,7 µm (3-4,5; D.S. 0,357), larghezza 2,2 µm (2-3; D.S. 0,334). All'esame istologico a piccolo ingrandimento si osservava una massa rotondeggiante a margini irregolari non circoscritta, all'interno della quale le fibre muscolari apparivano abnormemente alterate. A maggior ingrandimento le fibre erano infarcite di elementi parassitari riferibili a mixosporidi in diversi stadi di sviluppo. Le cellule muscolari si presentavano in necrosi con nuclei picnotici ed ipertrofici. Alla periferia della lesione la muscolatura era atrofica, in degenerazione ialina e con lieve risposta infiammatoria macrofagica. Alla colorazione di Giemsa i parassiti ai margini dell'area interessata apparivano invadere gli spazi interstiziali. Nel rene erano presenti granulomi senza che fossero evidenziati mixosporidi al loro interno. Dall'allevamento d'origine sono stati inoltre prelevati dal fondo delle vasche alcuni anellidi oligocheti allo scopo di individuare gli ospiti alternati del parassita. E' stato possibile reperire un solo soggetto appartenente alla specie *Branchiura sowerbi* contenente stadi actinosporei riferibili a *Raabeia*. Le osservazioni morfometriche condotte sulle spore hanno permesso di identificarle come mixosporidi del genere *Myxobolus*. Alcuni caratteri morfologici sono inoltre apparsi sovrapponibili a quanto riportato per la specie *Myxobolus cultus*, già descritta nello stesso ospite in corso di infezione sperimentale ma riscontrata solo a livello del tessuto cartilagineo. Poiché i pesci infetti provenivano da un allevamento in cui non era stata effettuata alcuna nuova introduzione da diversi anni, l'infezione potrebbe essersi instaurata in seguito all'ingresso di spore o stadi actinosporei con l'acqua di alimentazione e successiva realizzazione del ciclo alternato del parassita.

## LIVELLI DI CADMIO E CROMO IN PESCI D'ACQUA DOLCE: NOTA PRELIMINARE

M.C. Abete<sup>1</sup>, R. Tarasco<sup>1</sup>, L. Locatelli<sup>2</sup>, D. Pavino<sup>1</sup>, B. Campo Dall'Orto<sup>2</sup>, S. Gavinelli<sup>1</sup>, M. Prearo<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento Chimico, Laboratorio Metalli Pesanti, Istituto Zooprofilattico Sperimentale, Via Bologna 148, 10154 Torino

<sup>2</sup> Centro per lo Studio delle Malattie dei Pesci e Acquacoltura, Istituto Zooprofilattico Sperimentale, Via Bologna 148, 10154 Torino

La contaminazione degli ambienti acquatici da metalli pesanti, costituisce uno fra i tanti problemi di tossicologia ambientale. La pericolosità di questi elementi chimici deriva dal fatto che essi non sono biodegradabili e pertanto diffondendosi nell'ambiente, si accumulano lungo la catena alimentare, giungendo sino all'uomo.

Alcuni metalli pesanti, presentano il fenomeno della biomagnificazione: le loro concentrazioni aumentano progressivamente nel passaggio attraverso i diversi anelli della catena biologica alimentare. Certi organismi acquatici possono bioconcentrare i metalli pesanti fino a livelli 100.000 volte superiori a quelli presenti nelle acque in cui vivono.

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di valutare le concentrazioni di due metalli quali cadmio e cromo, in pesci dulciacquicoli d'allevamento e delle acque libere di alcuni corsi d'acqua piemontesi, onde evidenziare l'eventuale livello di inquinamento. La scelta di tali metalli è stata dettata dal loro ampio impiego industriale e dalla conseguente presenza negli scarichi, oltre che dalla loro riconosciuta tossicità.

Sono stati analizzati complessivamente nel primo semestre 2002, 66 campioni, di cui 35 provenienti da allevamenti e i restanti 31 dai corrispondenti bacini idrografici.

La determinazione dei suddetti metalli è stata condotta mediante spettrofotometria ad assorbimento atomico con atomizzazione elettrotermica e correzione del fondo con effetto Zeemann.

Per quanto riguarda il cromo il limite di quantificazione del metodo di analisi è di 50 ppb; tutti i campioni d'allevamento sono risultati inferiori al limite, mentre in 12 matrici delle acque libere analizzate si sono rinvenuti livelli modesti di tale metallo. Il metodo di analisi del cadmio, invece, ha un limite di quantificazione di 10 ppb: in tutti i campioni analizzati la concentrazione è risultata inferiore.

Da questa indagine preliminare, condotta su un piccolo territorio e su un esiguo numero di campioni, si può trarre la conclusione che a tutt'oggi non esiste un pericolo reale di contaminazione di questo tipo di filiera alimentare. D'altronde mentre per il cromo non esiste attualmente una normativa che regoli i tenori massimi, per il cadmio, il regolamento CE n° 466/2001 definisce il tenore massimo di questo elemento a seconda del tipo di prodotto ittico.

## ANALISI PRELIMINARE SULLA PRESENZA DI ARSENICO TOTALE IN PRODOTTI ITTICI NAZIONALI E D'IMPORTAZIONE

M.C. Abete<sup>1</sup>, E. Rela<sup>2</sup>, R. Tarasco<sup>1</sup>, E. Pavoletti<sup>2</sup>, D. Pavino<sup>1</sup>, P. Arsieni<sup>2</sup>, M. Prearo<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento Chimico, Laboratorio Metalli Pesanti, Istituto Zooprofilattico Sperimentale, Via Bologna 148, 10154 Torino

<sup>2</sup>Centro per lo Studio delle Malattie dei Pesci e Acquacoltura, Istituto Zooprofilattico Sperimentale, Via Bologna 148, 10154 Torino

L'arsenico è un elemento con caratteristiche chimico-fisiche tra quelle dei metalli e dei non metalli; è presente nell'ambiente sia per naturali processi di erosione che per attività antropiche. In passato è stato principalmente impiegato nell'industria chimica con applicazioni in prodotti agro-chimici e farmaceutici.

Poiché l'arsenico è un veleno persistente la possibilità che possa arrivare alla catena alimentare umana ha portato a restrizioni nell'utilizzo dei composti arseniacali. In natura l'arsenico è presente come composti inorganici e organici; la sua tossicità è in relazione alle forme chimiche: i composti inorganici sono più tossici di quelli organici.

I prodotti ittici possono contenere arsenico in alte concentrazioni, specialmente i molluschi ed i crostacei. La maggior parte dell'arsenico in questi prodotti è in forma organica, rapidamente escreta dall'organismo umano e di bassa tossicità.

Per tale elemento non esistono limiti soglia dettati dalla legislazione; inoltre le metodologie di analisi attualmente in uso prevedono la determinazione dell'arsenico totale (organico ed inorganico); tutto questo non consente la valutazione dell'effettiva tossicità degli alimenti eventualmente contaminati.

In questo lavoro si forniscono risultati preliminari sul contenuto di arsenico totale in alcune specie ittiche nazionali e d'importazione, suddividendo ulteriormente le campionature in pesci e crostacei/molluschi. Inoltre le concentrazioni riscontrate nel pescato nazionale vengono correlati con le concentrazioni rilevate in pesce d'allevamento. Tale indagine ricopre l'anno 2001 ed il primo semestre 2002, per un totale di 147 campioni analizzati, dei quali 90 nazionali e 57 di provenienza estera. I dati ottenuti evidenziano una concentrazione media di arsenico totale maggiore nei prodotti della pesca nazionale. Considerando, poi, i valori riscontrati nel pesce nazionale si nota una significativa differenza nei livelli di arsenico tra i prodotti della pesca e quelli d'acquacoltura: il valore medio nel pescato è di 4,21 ppm a fronte dei 0,02 ppm del pesce allevato.

Le concentrazioni di arsenico rilevate in alcuni campioni di molluschi cefalopodi e nei crostacei, sia nazionali che esteri, sono piuttosto elevate e possono costituire motivo di preoccupazione nel caso di elevati consumi di prodotti ittici marini, anche se la valutazione tossicologica dovrebbe essere effettuata dopo la determinazione della componente inorganica.

# ANOMALIE DELL' OPERCOLO E RECUPERO DELLA LORO INTEGRITÀ ANATOMICA IN ORATA (*SPARUS AURATA*, L. 1758): DATI PRELIMINARI DELL' ANALISI MORFOMETRICA

P. Beraldo<sup>1</sup>, P. Benedetti<sup>2</sup>, M. Caggiano<sup>3</sup>, M. Galeotti<sup>1</sup>, B. Canavese<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Università degli Studi di Udine, Facoltà di Medicina Veterinaria, via delle Scienze, 206 - Udine.

<sup>2</sup> Ca' Zuliani srl, Monfalcone (GO).

<sup>3</sup> Panittica Pugliese srl, Torre Canne di Fasano (BR).

Le anomalie dell' opercolo sono state descritte in passato, ma continuano a essere osservate in diverse specie ittiche sia selvatiche sia di allevamento. Tuttavia nelle specie allevate e specialmente nell' orata, il fenomeno si osserva con maggiore frequenza, soprattutto durante gli stadi giovanili. Tra le malformazioni della regione cefalica, quelle del complesso opercolare sono le più comuni e frequenti e, pur non essendo le più gravi, sono comunque in grado di pregiudicare fortemente le prestazioni zootecniche, l' immagine e il valore di mercato del prodotto stesso. La presenza di queste anomalie, sovente in percentuale elevata e, per certi aspetti, allarmante, obbliga molte avannotterie, con aumento inevitabile dei costi di produzione, a selezionare la popolazione allevata allo scopo di eliminare i soggetti portatori. Tuttavia alcune osservazioni in campo, che il presente lavoro intende verificare, suggeriscono l' ipotesi che le forme dimorfiche di partenza possano col tempo diminuire di numero in virtù di una più o meno completa “*restitutio ad integrum*” di alcune, o comunque modificare il loro aspetto con il progressivo miglioramento dell' immagine.

Ai fini sperimentali, è stato individuato un lotto di avannotti della medesima partita con anomalie opercolari unilaterali, aventi un peso medio di 0,8g. Il lotto di partenza è stato poi suddiviso in 3 gruppi di circa 1000 soggetti, scelti in base al tipo e alla gravità crescente dell' anomalia. Ad intervalli di 21gg, da ciascun gruppo sono stati prelevati 50 soggetti, i quali sono stati pesati, misurati per la determinazione della lunghezza standard e fotografati a fresco con camera digitale riprendendo la regione dell' opercolo. Le singole fotografie sono state sottoposte ad analisi d' immagine per acquisire dati che consentissero di valutare l' entità del recupero della formazione opercolare difettosa. A tal fine, per ogni caso, sono state misurate due aree T-A e T, il cui rapporto (T-A)/T tendente a 1, costituisce l' indicatore (IRi) di una normalità che nel tempo viene in parte a ripristinarsi. L' area T corrisponde alla superficie del rettangolo costruito in base a punti di *repere* fissi, mentre l' area A corrisponde alla superficie di esposizione branchiale, determinata dal grado di arretramento del margine libero del complesso opercolare. I risultati preliminari, dopo 8 prelievi, indicano che il ripristino delle condizioni di normalità anatomica del complesso opercolare, probabilmente soggetto a un processo di rigenerazione, è in atto, ma procede nei soggetti dei 3 gruppi in modo differente. Esso appare come fenomeno piuttosto vistoso e non ancora concluso quando i soggetti hanno raggiunto circa 7 mesi di vita, aventi taglia e peso medi rispettivamente di 110 mm e 45g.

## CAMBIAMENTI DI FORMA DELLE ANOMALIE DELL'OPERCOLO IN ORATA (*SPARUS AURATA* L. 1758): VERIFICA ALLO STEREOMICROSCOPIO DEL PROCESSO DI RECUPERO DELL'INTEGRITÀ ANATOMICA

P. Beraldo<sup>1</sup>, P. Benedetti<sup>2</sup>, M. Caggiano<sup>3</sup>, M. Galeotti<sup>1</sup>, B. Canavese<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Università degli Studi di Udine, Facoltà di Medicina Veterinaria, via delle Scienze, 206 – Udine.

<sup>2</sup> Ca' Zuliani srl, Monfalcone (GO).

<sup>3</sup> Panittica Pugliese srl, Torre Canne di Fasano (BR).

Le anomalie dell'opercolo di molte specie ittiche, compresa l'orata, sono state descritte sotto il profilo morfo-strutturale e, pertanto, le tipologie fondamentali alle quali fare riferimento sono note. Nell'orata (*Sparus aurata* L. 1758) di allevamento il fenomeno si osserva con frequenza talora elevata a partire dagli stadi larvali. La presenza di questa dell'anomalia costringe molte avannotterie, con aumento inevitabile dei costi di produzione, a selezionare la popolazione allevata allo scopo di eliminare i soggetti portatori. Tuttavia alcune osservazioni in campo, che il presente lavoro intende verificare, indicano che questi difetti dell'opercolo col tempo diminuiscono di numero perché può subentrare una più o meno completa “*restitutio ad integrum*”, oppure modificano il loro aspetto evolvendo verso forme anomale di minore gravità.

Ai fini sperimentali, è stato individuato un lotto di avannotti della medesima partita con anomalie opercolari unilaterali, aventi un peso medio di 0,8g. Il lotto di partenza è stato poi suddiviso in 3 gruppi di circa 1000 soggetti, scelti in base al tipo e alla gravità crescente dell'anomalia. Ad intervalli di 21 gg., da ciascun gruppo sono stati prelevati 50 soggetti, che sono stati osservati a fresco allo stereomicroscopio e, in parte, fotografati con camera digitale riprendendo la regione dell'opercolo. Con l'osservazione dei soggetti al momento della costituzione dei tre gruppi (I, II e III) sono stati annotati per ognuno gli ambiti o “intorni malformativi” principali di partenza (**I**.A, B; **II**.C, D, E; **III**.H, I, L), passibili poi di avere subito cambiamenti al successivo prelievo (**I**.A, B ➤ NOR; **II**.C, D, E ➤ B, A ➤ NOR; **III**.H, I, L ➤ C, D, E ➤ B, A ➤ NOR) fino al raggiungimento della normalità dell'esteriore conformazione opercolare (NOR).

I risultati preliminari, dopo 8 prelievi effettuati durante i primi sette mesi di vita, indicano che si è potuto assistere a una ridistribuzione continua degli “intorni malformativi” principali. Vi è una tendenza costante che porta a comprendere via via le nuove forme difettose diventate nel tempo meno gravi. Si assiste quindi ad un graduale recupero dell'integrità anatomica del complesso opercolare. Questo spostamento della mappa di distribuzione verso la normalità, rappresenta un processo di rigenerazione del complesso opercolare, e visualizza morfologicamente e significativamente quanto è in atto, anche se tale processo avanza in modo differente nei 3 gruppi. Esso sottolinea, più di quanto non faccia l'analisi morfometrica, l'attivo dinamismo dei gruppi che comprendono i soggetti portatori del difetto di grado maggiore, i quali, tuttavia, con minori probabilità raggiungeranno la normalità.

## PROVE DI ALLEVAMENTO E PATOLOGIE DEL DENTICE (*DENTEX DENTEX*, L.) IN SARDEGNA

F. Salati<sup>1</sup>, A. Meloni<sup>1</sup>, C. Cubadda<sup>1</sup>, I. Viale<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna, Centro di Referenza per l'Ittiopatologia e l'Acquacoltura, Via Parigi, 09170 Oristano, Italy.

<sup>2</sup> Porto Conte Ricerche, S.P. 55 Porto Conte-Capo Caccia, 07041 Tramariglio (SS), Italy.

L'obiettivo del presente lavoro è stato quello di valutare la possibilità di allevamento del dentice (*D. dentex*) in Sardegna al fine di evidenziarne le problematiche e le patologie più ricorrenti. 30.300 dentici del Peso Medio di circa 34 g sono stati distribuiti in tre allevamenti intensivi, con vasche a terra in pvc od in cemento. Lo studio ha avuto una durata complessiva di dodici mesi. Il periodo della ricerca è stato diviso in due fasi, in funzione delle temperature di allevamento: la prima corrispondente al periodo invernale, con temperature dell'acqua inferiori ai 15°C, e la seconda a quello primaverile-estivo-autunnale, con temperature dell'acqua superiori ai 15°C. Durante la sperimentazione, i pesci sono stati alimentati con un mangime commerciale per specie ittiche marine: le dosi giornaliere di alimento somministrate (% p.v.) corrispondevano a quanto suggerito dalle industrie mangimistiche alle relative temperature di allevamento. La crescita dei dentici è stata monitorata mediante biometrie periodiche a cadenza trimestrale effettuate su 50 soggetti per campionamento. La diagnostica ittiopatologica è stata effettuata su 42 campionamenti per un totale di 513 soggetti esaminati studiando i casi di malattia sia dal punto di vista delle lesioni anatomo-patologiche, che microbiologico, quest'ultimo mediante l'utilizzo di metodiche di microbiologia classica. Oltre ad i test biochimici, di alcuni ceppi sono state effettuate in parallelo le Gallerie API 20E e/o 20NE e/o Staph (Biomerieux). L'esame parassitologico esterno e delle branchie è stato effettuato mediante osservazione allo stereo microscopio; inoltre è stato eseguito l'esame a fresco del raschiato della mucosa intestinale e del liquido biliare per l'evidenziazione dei protozoi endoparassiti.

Dal punto di vista zootecnico, nei mesi invernali (prima fase) la crescita è stata riscontrata solamente nei pesci allevati nelle vasche in cemento, ove la temperatura dell'acqua veniva mitigata con quella di pozzo: in questo caso i dentici sono passati in tre mesi da 34 a 70 g di peso medio. Le biometrie effettuate nel mese di agosto hanno fatto registrare un peso medio di 135 g e di 120 g nelle vasche in pvc e di circa 200 g nell'impianto con le vasche in cemento.

Dal punto di vista ittiopatologico, sono stati isolati batteri appartenenti ai gruppi *Flavobacterium* e *Vibrio* tra i Gram-negativi e *Staphylococcus* tra i Gram-positivi. All'esame parassitologico è stata riscontrata saltuariamente la presenza dell'ectoparassita *Diplectanum* sp. nelle branchie e, nel periodo compreso tra la fine di maggio ed agosto, sono stati evidenziati costantemente endoparassiti ascrivibili ai Myxosporidi e l'ectoparassita *Oodinium* sp., che ha causato due forti morie.

In conclusione è possibile ritenere che le basse temperature che si registrano in Sardegna durante i mesi invernali possono limitare l'allevamento del dentice in quanto, nelle annate più fredde, possono essere causa di forti mortalità e di scarso accrescimento. Nei mesi primaverili ed estivi, i pesci possono far registrare degli accrescimenti interessanti; tuttavia la riuscita dell'allevamento può essere facilmente inficiata dalle patologie: tra queste sono da ricordarsi quelle batteriche sostenute da germi appartenenti ai gruppi: *Flavobacterium*, *Vibrio* e raramente *Staphylococcus* e, soprattutto, quelle da endoparassiti ascrivibili ai Myxosporidi aggravate da episodi di ectoparassitosi branchiale da *Oodinium* sp., a cui il dentice risulta essere particolarmente sensibile.

## SETTICEMIA EMORRAGICA VIRALE E NECROSI EMATOPOIETICA INFETTIVA: RISULTATI DEI MONITORAGGI REGIONALI

M. Prearo<sup>1</sup>, E. Rela<sup>1</sup>, L. Locatelli<sup>1</sup>, P. Arsieni<sup>1</sup>, B. Campo dall'Orto<sup>1</sup>, E. Pavoletti<sup>1</sup>, G. Mazzanti<sup>2</sup>, P. Vignetta<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Centro per lo Studio delle Malattie dei Pesci e Acquacoltura, Istituto Zooprofilattico Sperimentale, Via Bologna 148, 10154 Torino

<sup>2</sup> ASR 2, Zona Valle del Serchio, U.O. Sanità Animale, Poliambulatorio S.C., Via Letizia 44, 55022 Bagni di Lucca (LU)

<sup>3</sup> Regione Piemonte, Assessorato alla Sanità, Direzione Sanità Pubblica, Settore Sanità Animale e Igiene degli Allevamenti, C.so Stati Uniti 1, 10100 Torino

La Setticemia Emorragica Virale (SEV) comparsa in Italia negli anni '60 e la Necrosi Ematopoietica Infettiva (NEI) segnalata in Europa nel 1987, sono malattie di origine virale che hanno avuto grande diffusione in tutta Europa anche a causa della frenetica commercializzazione di materiale vivo e della carenza, fino agli inizi degli anni '90, di una regolamentazione sanitaria specifica.

Con la direttiva 91/67/CE, recepita in Italia con il D.P.R. 555 del 30/12/92 e successive modifiche, si è messo in atto in Italia, come in Europa, un piano di Polizia Sanitaria per disciplinare la commercializzazione di animali e prodotti dell'acquacoltura, dettando i requisiti necessari per il conseguimento del riconoscimento comunitario di aziende indenni da dette patologie. Nel nostro Paese, l'adesione al piano ha carattere volontario ed il conseguimento dello status di zona o azienda indenne permette sia la commercializzazione dei prodotti ittici con zone o aziende di pari stato sanitario, sia la semina in acque pubbliche. In Piemonte, con la nota protocollo 1419/27/003 del 12/10/99 e successive, si è stabilito di operare uno screening esteso a tutte le trottocolture, al fine di monitorare la diffusione delle patologie suddette e definire lo stato sanitario della regione.

A partire dal gennaio 2000, il Centro per lo Studio delle Malattie dei Pesci e Acquacoltura dell'IZS di Torino, ha effettuato analisi virologiche su campioni provenienti dal proprio bacino d'utenza (Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta) e dalla Toscana.

Le analisi di laboratorio sono state condotte con la tecnica di isolamento su colture cellulari e gli eventuali campioni non negativi, saggiati mediante immunofluorescenza indiretta. La conferma della positività è stata successivamente effettuata dal Centro di Referenza Nazionale di Legnaro (PD).

I risultati delle analisi conseguiti in questo arco di tempo hanno permesso di identificare due allevamenti positivi per NEI in Piemonte, 1 caso di SEV in acque libere del bacino del Po ed un allevamento positivo per SEV in Toscana.

## NOTA SU UN CASO DI SETTICEMIA EMORRAGICA VIRALE IN LUCCIO (*ESOX LUCIUS*) SELVATICO. APPROCCIO ALLE DIVERSE METODICHE DIAGNOSTICHE

M. Prearo<sup>1</sup>, E. Rela<sup>1</sup>, E. Pavoletti<sup>1</sup>, P. Vignetta<sup>3</sup>, D. Prearo<sup>1</sup>, L. Pramaggiore<sup>1</sup>, C. Ghittino<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Centro per lo Studio delle Malattie dei Pesci e Acquacoltura, Istituto Zooprofilattico Sperimentale, Via Bologna 148, 10154 Torino

<sup>2</sup> Centro di Ittiopatologia ed Acquacoltura, Istituto Zooprofilattico Sperimentale, Via Salvemini 1, 06126 Perugia

<sup>3</sup> Regione Piemonte, Assessorato alla Sanità, Direzione Sanità Pubblica, Settore Sanità Animale e Igiene degli Allevamenti, C.so Stati Uniti 1, 10100 Torino

La Setticemia Emorragica Virale (SEV) è una patologia sostenuta dal virus di Egtved, Rhabdovirus che colpisce principalmente i salmonidi, ma più volte descritto anche nel luccio. Nel marzo del 2002 è pervenuto al laboratorio di Ittiopatologia dell'IZS di Torino un esemplare di luccio (*Esox lucius*) pescato nelle acque del fiume Po, in provincia di Alessandria. Il soggetto presentava evidenti lesioni macroscopiche non imputabili a traumi, ma più probabilmente alla presenza di una patologia di tipo infettivo.

Gli esami batteriologico e parassitologico eseguiti routinariamente, hanno dato esito negativo. L'esame virologico, condotto mediante la tecnica di isolamento su colture cellulari a partire da un omogenato di organi, ha invece messo in evidenza un marcato effetto citopatico, caratteristico dei Rhabdovirus.

L'identificazione del virus è stata eseguita con immunofluorescenza indiretta, Elisa a sandwich, Elisa Bio perossidasi su monostrato cellulare e sieroneutralizzazione, che hanno evidenziato la presenza dell'agente patogeno in questione. I risultati sono stati messi a confronto con quelli ottenuti utilizzando ceppi di referenza di virus della Setticemia Emorragica Virale, della Necrosi Ematopoietica Infettiva e campioni negativi. L'approccio alle diverse tecniche ha permesso di effettuare una panoramica sulle varie possibilità offerte dal mercato, nel tentativo di facilitare le scelte diagnostiche in relazione alle diverse esigenze di laboratorio.

In seguito all'accertamento della positività alla SEV, il caso è stato segnalato agli enti competenti e sono state svolte le opportune indagini epidemiologiche.



## GENOTIPIZZAZIONE DI CEPPI DI IHNV COME STRUMENTO EPIDEMIOLOGICO DI INDAGINE E VERIFICA: ESPERIENZA IN PROVINCIA DI TRENTO.

G. Cattoli, G. Bovo, S. Maniero, L. Selli.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, via Romea 14/a - 35020 Legnaro (PD).

Nel periodo tra il 1997 ed il 2002 si sono registrati vari focolai di infezione da IHNV in alcuni allevamenti della provincia di Trento che già avevano raggiunto lo *status* di aziende riconosciute secondo il DPR 555/92 o che stavano per raggiungerlo a breve. Per alcuni di questi focolai le indagini epidemiologiche condotte non sono riuscite a chiarire appieno come l'infezione sia stata introdotta nell'allevamento né se i casi di malattie nei diversi impianti ittici fossero o no tra loro collegati. Scopo della ricerca è quello di tipizzare geneticamente, mediante l'analisi delle sequenze del gene N e NV, i ceppi di IHNV provenienti dai focolai trentini ed affiancare questi dati alle informazioni scaturite dalle indagini epidemiologiche al fine di potere meglio chiarire l'origine dell'infezione. Quindici ceppi di IHNV sono stati inclusi nella presente indagine. Di questi, otto rappresentano isolamenti singoli da altrettanti allevamenti trentini; tre rappresentano ceppi virali provenienti dallo stesso allevamento in periodi successivi. Due ceppi provengono da allevamenti situati fuori provincia ma con collegamenti epidemiologici agli impianti trentini. Altri due ceppi provengono da allevamenti fuori provincia senza alcuna evidente connessione e sono inclusi nello studio come riferimenti esterni. Il gene N e NV di ciascun virus è stato amplificato mediante RT-PCR da RNA estratto dal surnatante di colture cellulari. Gli amplificati sono stati successivamente sequenziati e le sequenze sono state allineate utilizzando il *software* ClustalX. Per l'analisi filogenetica si sono utilizzati i programmi contenuti in PHYLIP vers. 3.572: i risultati sono rappresentati per ciascun gene come dendrogrammi ottenuti mediante l'analisi del *maximum likelihood method*. In aggiunta, gli stessi dati sono stati analizzati mediante *neighbour joining method* e sottoposti a verifica mediante analisi statistica ottenuta attraverso 500 ripetizioni con ricampionamenti random dei file di imput (*bootstrap*). L'analisi della sequenza del gene N è stata eseguita in media su 495 nucleotidi e corrispondenti approssimativamente al 40 % del gene. Per il gene NV l'analisi è stata eseguita in media su 336 nucleotidi comprendenti il gene nella sua totalità. L'analisi filogenetica delle sequenze dei geni N e NV, eseguita in maniera distinta, ha raggruppato gli isolati in modo assolutamente sovrapponibile: entrambi i dendrogrammi mostrano la presenza di tre gruppi geneticamente distinti, raggruppamenti supportati dalla analisi statistica. Se a questi risultati affianchiamo i dati provenienti dalle indagini epidemiologiche possiamo concludere che: i) i tre gruppi genetici rappresentano tre distinti focolai che hanno interessato il trentino tra il 1997 e il 2002; ii) due di questi focolai appaiono estinti, indicando che le misure di eradicazione intraprese sono state efficaci; iii) un focolaio, iniziato nel 2000 e coinvolgente la maggior parte degli allevamenti considerati, è tuttora in corso. L'indagine di epidemiologia molecolare ha permesso di chiarire l'origine della infezione nella maggior parte degli allevamenti considerati. L'analisi della sequenza dei geni N e NV possiede un potere discriminante utilizzabile a fini epidemiologici. La genotipizzazione, se associata alla epidemiologia, rappresenta un valido strumento per il controllo della infezione da IHNV permettendo di chiarire l'origine della infezione in un allevamento o area geografica, di verificare l'efficacia dei piani di risanamento e di evidenziare eventuali fattori di rischio. Eventuali incongruenze, quali ceppi risultanti genotipicamente correlati ma senza alcuna apparente connessione epidemiologica, offrono lo spunto per indagini epidemiologiche più approfondite al fine di verificare la completezza e la veridicità delle informazioni.

## NECROSI PANCREATICA INFETTIVA (IPN) IN GIOVANILI DI TROTA IRIDEA (*ONCORHYNCHUS MYKISS*): ASPETTI ANATOMO-ISTOPATOLOGICI ATIPICI

D. Berton, D. Volpatti., M. Sarti\*, R. Giavenni\*\*, P. Beraldo, M. Galeotti

Unità di Patologia Generale ed Ittiopatologia, Facoltà di Medicina Veterinaria,  
Università di Udine

\*Hendrix S.p.a.

\*\*Chezzi S.p.a.

La necrosi pancreatica infettiva (IPN) è una malattia sostenuta da un Birnavirus, reponsabile di elevate mortalità in giovanili di salmonidi (generi *Salvelinus*, *Salmo* ed *Oncorhynchus*) allevati intensivamente.

Raramente sono stati osservati e descritti episodi morbosi in gruppi di pesci di età superiore alle 15 settimane di alimentazione. Infatti la malattia, per cui è stata descritta la trasmissione verticale, colpisce prevalentemente avannotti durante le prime fasi di allevamento.

Nel corso dell'ultima annata produttiva, in diverse trotiltture localizzate per lo più nel Triveneto, sono stati segnalati numerosi episodi di IPN coinvolgenti partite di giovanili di trota iridea con età superiore alle 15 settimane di alimentazione. Lo scopo della presente ricerca è quello di fornire una descrizione delle alterazioni anatomo-istopatologiche indotte da queste forme di malattia, che tendono ad assumere decorso cronico.

Un numero rappresentativo di soggetti prelevati nel corso degli episodi di malattia, è stato sottoposto ad indagine necroscopica ed istologica. Sezioni seriate di organi viscerali sono state colorate con E.E. o sottoposte ad indagine immunoistochimica al fine di evidenziare la presenza del virus. Allo scopo è stato utilizzato un anticorpo policlonale anti virus dell' IPN (Microtek).

I pesci oggetto di indagine, prelevati dai diversi allevamenti, risultavano tutti positivi per IPN all'esame immunoperossidasi. Nelle fasi iniziali della malattia presentavano, all'osservazione macroscopica, dilatazione del tratto gastro-intestinale. Lo stomaco conteneva un essudato sieroso, mentre nell'intestino risultava di tipo catarrale. Numerosi soggetti presentavano soffusioni emorragiche a livello dei cechi pilorici e del grasso periviscerale. Nelle fasi successive, in cui la malattia assumeva andamento cronico, erano riscontrabili anche atrofia ed alterazione del colore del fegato, tendente al rosa pallido. Nei soggetti con sintomatologia insorgente, l'istologia ha evidenziato una serie di lesioni classiche, attribuibili alle forme di malattia già descritte in letteratura. I soggetti con forma cronica al contrario presentavano vaste aree di necrosi epatica, nell'ambito delle quali si osservavano fenomeni di picnosi nucleare. Inoltre era evidenziabile una forte deplezione del tessuto pancreatico diffuso, parzialmente o totalmente sostituito da tessuto adiposo. A livello della parete intestinale si osservavano alterazioni flogistico-necrotiche caratterizzate dalla presenza di un infiltrato cellulare prevalentemente linfocitario.

Lo studio condotto ha consentito di fornire una descrizione delle lesioni anatomo-istopatologiche in giovanili di trota iridea in cui la malattia si è manifestata con un decorso prolungato nel tempo. Questa forma di malattia è caratterizzata da peculiari aspetti di necrosi epatica. Le osservazioni condotte si aggiungono a quanto descritto fino ad ora in letteratura per giovanili di età inferiore alle 15 settimane di alimentazione, affetti da necrosi pancreatica infettiva.

## EPISODIO INVERNALE DI ENCEFALO RETINOPATIA VIRALE IN BRANZINI (*DICENTRARCHUS LABRAX*) DI ALLEVAMENTO.

F. Borghesan, L. Selli, A. Manfrin, K. Qualtieri, S. Ormelli, G. Bovo

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Via Romea,14/A-35020 - Legnaro-PD

Durante i mesi di gennaio e febbraio 2002, nel reparto d'allevamento intensivo di un'azienda valliva situata in Veneto, si è verificato un episodio significativo di encefalo-retinopatia virale che ha interessato una popolazione omogenea di branzini (*Dicentrarchus labrax*).

La partita di pesci colpiti era costituita da circa 50.000 soggetti di taglia compresa fra 250 e 300 gr. (età 2<sup>+</sup>), allevati in un'unica vasca in cemento alla densità di 8 Kg pesce/m<sup>3</sup> d'acqua. La temperatura nel corso dell'episodio è oscillata tra +3°C e +7°C e la salinità era compresa tra valori di 3 e 3,5‰. Nel corso dell'episodio sono stati eseguiti diversi sopralluoghi nonché due campionamenti; il primo eseguito in gennaio, a distanza di alcuni giorni dalla comparsa della mortalità ed il secondo, in febbraio, ad episodio inoltrato. La sintomatologia riscontrata, nel corso dell'intero episodio, era riconducibile a quanto riportato in letteratura per casi di encefalo-retinopatia virale caratterizzata in particolare da anomalie natatorie. A fine episodio si è registrata una mortalità cumulativa pari al 8%.

Tutti i soggetti prelevati sono stati sottoposti ad indagini autoptiche, parassitologiche, batteriologiche e virologiche.

I risultati ottenuti hanno evidenziato presenza di lesioni cutanee di tipo erosivo a carico principalmente dell'area cefalica con particolare interessamento della rima buccale; l'esame parassitologico, condotto a livello branchiale, ha evidenziato una lieve infestazione da protozoi (*Trichodina* sp.) e trematodi (*Diplectanum* sp.); l'esame batteriologico ha evidenziato, nel 50% dei soggetti esaminati, un polimicrobismo variabile con presenza di *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas* sp., *Pseudomonas fluorescens*, *Vibrio fluvialis*, nel restante 50% i soggetti sono risultati negativi; l'esame virologico ha evidenziato la presenza dell'agente eziologico della encefalo-retinopatia in tutti i pool di soggetti esaminati.

Gli autori discutono sul significato patogenetico del ceppo virale isolato nel corso dell'episodio.

## INATTIVAZIONE DELL'AGENTE CAUSALE DELL'ENCEFALO-RETINOPATIA VIRALE MEDIANTE ESPOSIZIONE AD OZONO: PROVE PRELIMINARI

F. Borghesan<sup>1</sup>, P. Beretta<sup>2</sup>, C. Maltese<sup>1</sup>, S. Ormelli<sup>1</sup>, G. Bovo<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie - Via Romea, 14/A-35020, Legnaro (PD)

<sup>2</sup> AIR LIQUIDE ITALIA. S.r.l., Via A. Capecelatro 69, 20148 Milano

L'agente causale dell'encefalopatia e retinopatia virale del branzino è un virus a RNA privo di envelope, a simmetria icosaedrica con dimensioni di 25-30 nm., appartenente alla famiglia *Nodaviridae*.

La sua patogenicità è stata confermata in oltre 20 specie ittiche marine allevate sia allo stadio larvale che giovanile e/o adulto. Nel bacino del Mediterraneo le specie maggiormente colpite sono il branzino (*Dicentrarchus labrax*) e l'ombrina (*Umbrina cirrosa*). La malattia si trasmette normalmente per via orizzontale, attraverso la diffusione dell'agente nell'ambiente acquatico.

E' noto che la disinfezione dell'acqua, mediante trattamento fisico, può ridurre significativamente il rischio di diffusione di agenti infettivi nelle diverse fasi di allevamento. In acquacoltura l'impiego dei raggi UV, soprattutto nelle avannotterie marine, trova, da tempo, ampio impiego applicativo. Più recentemente alcuni autori hanno proposto l'adozione di impianti erogatori di ozono.

Con questo lavoro sono state effettuate alcune indagini preliminari per verificare l'azione dell'ozono nei confronti dell'agente causale dell'encefalo-retinopatia del branzino .

L'indagine principale è stata condotta facendo gorgogliare, all'interno di una beuta contenente acqua di mare (salinità 3% e temperatura 24°C) nel quale era stato sospeso il ceppo di riferimento 475/98 a titolo noto, flussi gassosi, a diverse concentrazioni di ozono (ppm 0,5 - 1,5 - 2 - 2,5), ottenute mediante un generatore portatile (Ozone Generator BMT 802). Analoghe indagini sono state ripetute con l'impiego di acqua dolce.

I controlli di citopatogenicità residua sono stati effettuati su colture cellulari SSN-1.

Il ceppo di riferimento impiegato è risultato sensibile all'azione dell'ozono con una riduzione del 100% di citopatogenicità dopo esposizione a concentrazioni superiori o uguali a 1,5 ppm . Tale valore sembra ridursi sensibilmente in acqua dolce.

I risultati ottenuti, se pur preliminari , in quanto necessitano l'approfondimento di alcuni dettagli, suggeriscono che l'impiego dell'ozono nel trattamento dell'acqua d'allevamento, possa senz'altro costituire un valido strumento per ridurre e/o eliminare la patogenicità del virus in un contesto di misure di igiene, profilassi e minimizzazione dell'impatto ambientale microbiologico.

ISOLAMENTO DI UN AGENTE VIRALE IRIDO-LIKE DA GIRINI DI RANA VERDE (*RANA ESCULENTA*), SIEROLOGICAMENTE CORRELATO ALL'AGENTE CAUSALE DELL'IRIDOVIROSI DEL PESCE GATTO COMUNE (*ICTALURUS MELAS*)

F. Borghesan, L. Selli, E. Cappellozza, P. Giacometti, F. Mutinelli, A. Manfrin, G. Bovo.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Via Romea, 14/A. 35020 Legnaro (PD)

A partire dal 1965 sono stati riportati, in letteratura, isolamenti di agenti virali da anfibi. Tra i dati più recenti s'inserisce il lavoro di Fijan e collaboratori che riporta l'isolamento di un ceppo di Iridovirus da rana verde (*Rana esculenta*), preliminarmente identificato come REIR. In seguito Ahne e collaboratori hanno evidenziato la presenza di relazioni antigeniche tra l'agente della Necrosi Ematopoietica Enzootica (EHN), una grave malattia del persico fluviale (*Perca fluviatilis*) e della trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*), l'iridovirus della rana esculenta (REIR) ed un agente irido-like (ECV) routinariamente isolato nel nostro territorio nel corso di gravi episodi di mortalità che hanno interessato il pesce gatto comune (*Ictalurus melas*), a partire dagli inizi degli anni 90.

L'identificazione di epitopi comuni tra il virus del pesce gatto (ECV) ed il virus della rana esculenta (REIR) ha fatto sorgere alcuni interrogativi sul potenziale ruolo degli anfibi nell'epidemiologia della "Iridovirosi" del pesce gatto.

Per questo motivo, nel corso della primavera 2002, sono state programmate alcune prove di infezione sperimentale di girini di rana verde per verificare la loro suscettibilità all'infezione con un ceppo di referenza di ECV.

Nel corso della sperimentazione è stata evidenziata la presenza, nel gruppo dei controlli negativi, di un agente virale, in grado di replicarsi su cellule EPC ed indurre comparsa di effetto citopatico con caratteristiche analoghe a ECV.

L'esame al M.E. ha rivelato che l'agente isolato è morfologicamente simile agli iridovirus. Il virus inoltre reagisce positivamente al test di immunofluorescenza eseguito con siero anti iridovirus del pesce gatto.

I risultati ottenuti confermano la presenza di antigeni virali irido-like negli anfibi selvatici e rafforzano l'ipotesi di un loro possibile ruolo nell'epidemiologia della "Iridovirosi" del pesce gatto. Purtroppo non è ancora possibile stabilire con certezza se il virus isolato dai girini di rana verde, in quest'episodio, sia lo stesso agente che viene isolato routinariamente nel corso di episodi di "Iridovirosi" del pesce gatto.

Per questo motivo è necessario approfondire le indagini al fine di stabilire le relazioni sierologiche e genotipiche di questi due agenti e condurre un'indagine epidemiologica, nelle popolazioni selvatiche di anfibi, per verificare la prevalenza e chiarire l'eventuale ruolo di serbatoi per la diffusione del virus nell'ambiente.