

## INFEZIONE SPERIMENTALE CON *FLAVOBACTERIUM PSYCHROPHILUM* IN TROTA IRIDEA (*ONCORHYNCHUS MYKISS*) PER VIA INTRA PERITONEALE E PER BAGNO

Manfrin A.<sup>1</sup>, Tonon P.<sup>1</sup>, Cervellone F.<sup>2</sup>, Qualtieri K.<sup>1</sup>, Selli L.<sup>1</sup>, Bovo G.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro (PD); <sup>2</sup> Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Milano, Milano

*Flavobacterium psychrophilum* è un agente patogeno responsabile di gravi perdite nelle avannotterie, in quanto si può manifestare sia nella forma cutanea, flavobatteriosi d'acqua fredda (Cold Water Disease) o malattia del peduncolo, spesso associata alla malattia branchiale, sia nella forma prevalentemente viscerale, sindrome dell'avannotto della trota iridea o Rainbow Trout Fry Syndrome (RTFS). Tali patologie si sviluppano in acque con temperature inferiori a 15-16° C e la loro diagnosi eziologica risulta spesso complessa. *F. psychrophilum* è infatti un microrganismo esigente e il suo isolamento presenta delle difficoltà, non crescendo sui normali terreni di coltura e a 22° C, ma esclusivamente su terreni selettivi addizionati di latte scremato e sodio acetato, con sviluppo di colonie gialle dopo 3-7 giorni di incubazione a 15-18° C. Diversi autori stanno da anni cercando di mettere a punto dei vaccini per contrastare la flavobatteriosi, ma trattandosi di un microrganismo esigente risultano difficili sia la preparazione dell'inoculo, sia le prove di infezione sperimentale. A tal riguardo, abbiamo effettuato alcune prove di infezione sperimentale al fine di determinare la DL<sub>50</sub> di *F. psychrophilum* nei confronti di avannotti di trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*), utilizzando il ceppo di referenza n. 1947 della National Collection of Industrial and Marine Bacteria (NCIMB) e un ceppo di campo (53/03) isolato da avannotti di trota iridea di circa 2 g. durante un episodio clinico. Nella prima prova sono stati inoculati per via i.p. 4 gruppi di 20 avannotti di 2 g., stabulati in vasche tronco coniche di 40 litri cad. con una temperatura dell'acqua di 11±1° C, iniettando 0,1 mL di sospensione batterica ad una concentrazione finale di 10, 10<sup>2</sup>, 10<sup>3</sup> e 10<sup>4</sup> batteri/pesce rispettivamente. Per 45 giorni è stata registrata la mortalità in ogni singola vasca e da ciascun soggetto morto è stato effettuato l'esame batteriologico. Una seconda prova è stata eseguita, con modalità analoghe, su cinque gruppi di 30 avannotti di circa 2 g. in doppio (dieci vasche in totale), mentre le concentrazioni delle soluzioni iniettate erano rispettivamente 10<sup>2</sup>, 10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup>, 10<sup>5</sup> batteri/pesce. L'osservazione degli animali è durata 30 gg. e su tutti i soggetti rinvenuti morti sono state eseguite delle impronte dalla milza e successiva colorazione con fucsina per verificare al microscopio ottico l'eventuale presenza di batteri filamentosi. Nella terza prova sono stati utilizzati 800 soggetti del peso di circa 3 g. stabulati in 10 vasche, sempre con temperatura dell'acqua di 11±1° C. Bloccando il flusso idrico il livello dell'acqua è stato abbassato fino ad un volume pari a 10 litri/vasca e la sospensione infettante è stata aggiunta in modo tale da ottenere le seguenti concentrazioni batteriche: 10<sup>7</sup>, 10<sup>6</sup>, 10<sup>5</sup>, 10<sup>4</sup> batteri/mL. I pesci sono rimasti a contatto con la soluzione infettante per 30 minuti, dopodiché veniva ripristinato il flusso idrico a circuito aperto. A distanza di circa cinque settimane è stata effettuata una seconda infezione per bagno, svolta secondo le stesse modalità della precedente. In entrambe le prove gli animali sono rimasti in osservazione per 30 gg. e su tutti i soggetti rinvenuti morti sono state eseguite delle impronte dalla milza su vetrino e successiva colorazione con fucsina, per verificare l'eventuale presenza di Flavobatteri. Solo nella prima infezione per via i.p. è stato possibile determinare una DL<sub>50</sub> pari a 10<sup>4</sup> batteri/pesce, mentre nelle altre tre prove la mortalità non è risultata significativa. Analoghi risultati sono stati ottenuti da altri autori in quanto, trattandosi di un microrganismo particolarmente esigente, difficile da conservare per lunghi periodi e che assume di frequente particolari caratteristiche di resistenza (viable but non culturable bacteria), la ripetibilità e riproducibilità delle infezioni sperimentali sono estremamente difficili da determinare.

## **CONTRIBUTO PRATICO PER LA DIAGNOSI DI *FLAVOBACTERIUM PSYCHROPHILUM* IN EPISODI DI INFEZIONE NELLA TROTA IRIDEA (*O. MYKISS*)**

Mangiarotti A., Salogni C., De Simone N., Alborali L.

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Via A. Bianchi, 7 – 25100 Brescia*

*Flavobacterium psychrophilum* è l'agente eziologico della Rainbow Trout Fry Syndrome e della Bacterial Cold Water Disease.

Sebbene tale batterio sia stato isolato per la prima volta in Italia nel 1992 ancora oggi sono disponibili pochi studi completi sulla diagnosi di laboratorio. Questo lavoro vuole offrire un contributo pratico per la conferma diagnostica di flavobatteriosi.

Nel periodo compreso tra il 2003 e il 2004 sono stati seguiti quattordici episodi di infezione da *F. psychrophilum* in allevamenti di trota iridea.

Da ogni episodio sono stati individuate le partite di avannotti di trote con mortalità sospetta e prelevati soggetti che mostravano sintomi. Tali soggetti sono stati sottoposti all'esame anatomopatologico e selezionati per gli esami colturali quelli che evidenziavano una spiccata splenomegalia.

Ai fini diagnostici sono state prelevate le milze dei soggetti infetti, sottoposte a prelievo per l'esame colturale ed utilizzate per ottenere strisci e sezioni d'organo..

I tests di laboratorio eseguiti sono stati l'immunofluorescenza su sezione e striscio di milza, gli esami microscopico e colturale con l'identificazione dei batteri ottenuta mediante l'osservazione delle caratteristiche morfologiche delle colonie e la sieroaagglutinazione rapida. A tale proposito è stato utilizzato un siero policlonale di coniglio anti *F. psychrophilum* precedentemente allestito e testato.

I risultati ottenuti dimostrano l'utilità dei test sierologici ed in particolare dell'immunofluorescenza anche se l'esistenza di una notevole varietà di sierotipi di *F. psychrophilum* richiede ulteriori approfondimenti nell'impiego del siero allestito.

## EPISODIO DI FLEXIBATTERIOSI MARINA IN ROMBO CHIODATO (*SCOPHTHALMUS MAXIMUS* L.) IN ITALIA\*

Magi G.E.<sup>1,2</sup>, Melotti P.<sup>1</sup>, Roncarati A.<sup>1</sup> & Renzoni G.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Centro Universitario di Ricerca e Didattica in Acquacoltura e Maricoltura, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Camerino, viale Europa 6, 63039 San Benedetto del Tronto (AP); <sup>2</sup> Dipartimento di Scienze Veterinarie, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Camerino, via Circonvallazione 93/95, 62024 Matelica (MC)

L'allevamento del rombo chiodato ha conseguito negli ultimi 10 anni un notevole successo nell'ambito delle produzioni d'acquacoltura europee, soprattutto grazie alla nascita in Spagna di numerosi impianti tecnologicamente avanzati. Recentemente in Italia alcuni allevatori stanno tentando di introdurre questa specie a scopo produttivo, con il fine di diversificare le produzioni. Viene qui descritto un episodio di Flexibatteriosi marina in soggetti adulti di rombo chiodato di provenienza autoctona, mantenuti per lo svolgimento di prove di riproduzione e allevamento larvale.

Lo studio ha avuto una durata di 12 mesi, per il periodo compreso tra settembre 2002 e settembre 2003 ed è consistito nel controllare sotto il profilo sanitario uno stock di 5 soggetti adulti catturati nell'alto Adriatico, del peso compreso tra 1.700 e 5.100 g., mantenuti in due moduli funzionanti attraverso un sistema chiuso di filtrazione e ricircolo dell'acqua. Tutti i pesci appena giunti nell'impianto sperimentale risultavano normali all'esame visivo esterno, ad eccezione di un esemplare che presentava aree di arrossamento sulla superficie cutanea inferiore. All'esame parassitologico esterno sono stati osservati pochi ectoparassiti appartenenti al gruppo *Chilodonella-Brooklynella*-like. Due soggetti tre settimane dopo il loro arrivo hanno cominciato a manifestare lesioni erosive cutanee alla bocca, alle pinne e in modo più grave alla pinna caudale. Successivamente anche nei restanti tre pesci sono comparse lesioni erosive esterne a carattere localizzato sovrapponibili a quelle riscontrate nei pesci precedenti. L'esame microscopico del raschiato cutaneo delle lesioni ha evidenziato la presenza di batteri filamentosi lunghi classificati come *Flexibacter*-like. Il raschiato cutaneo è stato seminato nel terreno FMM (*Flexibacter maritimus* medium) incubato a 22° C dove sono state isolate in purezza colonie identificate, dopo caratterizzazione fenotipica e biochimica, come *Tenacibaculum maritimum*. I pesci sono stati sottoposti ad antibioticoterapia dopo antibiogramma. Nei mesi successivi i pesci ormai acclimatatisi hanno manifestato un buon stato di salute dimostrando una buona rusticità anche a temperature sopra i 20° C; solo quando la temperatura dell'acqua ha superato i 28° C i pesci hanno manifestato un forte stato di sofferenza caratterizzato da anoressia che ha richiesto l'abbassamento della temperatura dell'acqua attraverso climatizzazione dell'ambiente.

\* Ricerca condotta con fondi del V Piano Triennale della Pesca Marittima e dell'Acquacoltura – Progetto di Ricerca n° 5 C 64

## ASPETTI MICROBIOLOGICI E ANATOMO - ISTOPATOLOGICI IN CORSO DI FLAVOBATTERIOSI IN DENTICI D'ALLEVAMENTO

Mancuso M., Macrì B.<sup>o</sup>, Monaco S.<sup>o</sup>, Zaccone R., Paradiso M.L.<sup>o</sup>, Caruso G., Marino F.<sup>o</sup>

*Istituto per l'Ambiente Marino Costiero (IAMC) - CNR Sezione di Messina; Spianata S. Raineri 86 - 98122 Messina; <sup>o</sup> Dip. Sanità Pubblica Veterinaria, Università degli Studi di Messina, Polo Universitario dell'Annunziata - 98168 Messina*

Le Flavobatteriosi sono malattie infettive emergenti in maricoltura, soprattutto nel bacino del Mediterraneo, caratterizzate dalla comparsa di ulcere ed erosioni cutanee, accompagnate da cachessia e ritardo della crescita, raramente con esito letale. Tra le specie marine, le più sensibili all'infezione si sono dimostrate le spigole e le orate (Salati et al., 1999) e, più recentemente, i dentici allevati in Sardegna (Salati et al., 2003). Gli Autori riportano i quadri descrittivi caratterizzanti un focolaio spontaneamente occorso in un impianto siciliano per l'ingrasso off-shore di dentici (*Dentex dentex*). I soggetti campionati nel Febbraio 2003 sono stati sottoposti ad esame microbiologico ed istopatologico. L'identificazione microbiologica della specie permetteva di ascrivere i batteri causali alla specie *Tenacibaculum maritimus*. Le lesioni documentate sui soggetti malati erano riferibili ad erosioni cutanee, accompagnate da depigmentazione e/o emorragie, ulcere talora profonde sino ad interessare la muscolatura sottostante ed erosioni delle pinne e della coda. Istologicamente, le ulcere cutanee apparivano approfondirsi nel derma sottostante; quest'ultimo era caratterizzato da necrosi, infiltrato parvicellulare e dalla presenza di numerosi batteri filamentosi. L'entità del focolaio e la grave sintomatologia caratterizzante i soggetti colpiti nel caso riportato costituisce un'ulteriore conferma della pericolosità delle infezioni da flavobatteri per la maricoltura mediterranea, nonché del fatto che attualmente sia uno dei principali fattori limitanti lo sviluppo dell'allevamento del dentice.

## AEROMONOSI: NUOVE PATOLOGIE IN ACQUACOLTURA

Prearo M., Colussi S., Campo Dall'Orto B., Brunetti R., Pavoletti E.

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Via Bologna, 148 - 10154 Torino*

Numerosi studi sono stati condotti sul genere *Aeromonas*, sia in relazione alla capacità di sostenere setticemie in differenti specie poichiloterme, sia per il suo crescente interesse nel coinvolgimento in patologie umane, animali e come patogeni trasmissibili per via alimentare associate in particolar modo a prodotti d'acquacoltura.

Per quel che concerne le patologie ittiche, il genere *Aeromonas* è costituito generalmente da patogeni facoltativi e comprende differenti specie diffuse ubiquitariamente, con ampio spettro d'ospite (pesci d'acqua salmastra e d'acqua dolce), non dipendente dalla temperatura delle acque. Poiché le varie specie di *Aeromonas* fanno parte della popolazione microbica normale delle acque, possono essere isolate anche da pesci sani, ma le cattive condizioni ambientali e i fattori di stress possono trasformare questi organismi da innocui saprofiti a patogeni; notevole rilevanza riveste la densità dei pesci in vasca o la concentrazione di ammoniaca disciolta. Numerosi lavori scientifici hanno segnalato la presenza di diverse specie appartenenti al genere *Aeromonas*, tra cui *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. sobria*, *A. trota*, *A. bestiarum*, *A. veronii*, *A. encheleia*, ecc. (oltre ad *A. salmonicida* che è da annoverare tra i germi patogeni dei Salmonidi).

Le Aeromonosi, nella nostra esperienza, si stanno affermando quali patologie dominanti. Nel 2001 il 5,17% delle identificazioni batteriche effettuate era costituito da *Aeromonas hydrophila*; nel 2002 il 2,88% degli isolamenti era rappresentato da *Aeromonas*, il 64,28% delle quali da *A. hydrophila*, il 21,42% da *A. salmonicida* e il 14,28% da *A. sobria*. Nel 2003 è stato isolato l'1,17%: 45,45% di *A. hydrophila* e *A. salmonicida* e il 9,09% di *A. sobria*. Nel 2004 (sono stati considerati gli isolamenti fino all'inizio di Settembre 2004) è stato isolato il 16,35% di *Aeromonas*, con una netta prevalenza di *A. hydrophila*, 74,19%, a seguire *A. sobria* con il 20,96% e *A. salmonicida* con il 4,83%. Il 100% delle *A. hydrophila* isolate presentava attività  $\beta$ -emolitica; va sottolineato come le  $\beta$ -emolisine siano riportate tra i fattori di virulenza delle *Aeromonas* mobili.

I dati ottenuti non possono attestare la reale esistenza di un trend positivo poiché frutto di analisi di campioni routinari, non derivanti da piani di monitoraggio caratterizzati da parametri di campionamento, frutto di pianificazioni e mantenuti il più possibile costanti. Da ciò si evince come i campioni analizzati non rappresentino l'intera popolazione bensì costituiscano un campione distorto. Ciò è dovuto in particolar modo al fatto che ad un laboratorio di patologia ittica, pervengono campioni già di per sé problematici e che gli allevatori stessi e i veterinari di campo sono in grado, senza l'ausilio delle analisi di laboratorio, di diagnosticare patologie tipiche quali bocca rossa, foruncolosi e simili.

La diffusione delle Aeromonosi sembra possa essere stata favorita dalla liberazione di nuove nicchie ecologiche precedentemente occupate da patogeni per i quali vengono adottate misure profilattiche: *Lactococcus garvieae*, *Vibrio anguillarum*, *A. salmonicida* e così via.

Nei confronti delle Aeromonosi non esistono tuttora validi presidi immunitari, nonostante i numerosi tentativi atti a svilupparli. Non è inoltre da sottovalutare lo sviluppo di resistenze che inficiano i trattamenti terapeutici abitualmente in uso. Generalmente ossitetraciclina è considerata il trattamento elettivo nei confronti di queste patologie; purtroppo esso può risultare inefficace a causa della diffusa resistenza sviluppatasi, mediata da plasmidi.

## INFEZIONE DA *AEROMONAS HYDROPHILA* IN STORIONI SIBERIANI (*ACIPENSER BAERI*) D'ALLEVAMENTO

Colussi S., Gasparri F.<sup>1</sup>, Brunetti R., Ferrari A., Prearo M.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Via Bologna 148, 10154 Torino (Italia); <sup>1</sup> Skretting - Fraz. San Zeno, 37060 Mozzecane (VR)

La storionicoltura italiana ha avuto origine nel 1977 con il ripopolamento di storioni (*Acipenser naccarii*) autoctoni catturati nel bacino del Po. Nel 1988 sono comparsi i primi allevamenti di storione siberiano (*A. baeri*), originariamente importato dalla Russia alla Francia.

Le setticemie da *Aeromonas* mobili, germi ubiquitari, sono sostenute da diverse specie; sono batteri da considerarsi patogeni facoltativi, caratterizzati dall'aver un ampio spettro d'ospite (sia pesci marini sia d'acqua dolce). La comparsa delle Aeromonosi può essere favorita dalla concomitante presenza di infezioni virali o parassitarie. Non esistono segni clinici patognomonicamente per tali patologie: infatti, la sintomatologia è del tutto sovrapponibile a quella di altre setticemie batteriche, con lesioni ulcerativo-emorragiche a carico di cute e tessuto muscolare, necrosi delle pinne, esoftalmo e distensione addominale per la presenza all'interno della cavità celomatica di abbondante liquido sieroso-emorragico.

Le varie specie di *Aeromonas* appartengono alla normale popolazione microbica delle acque; pertanto possono essere isolate anche da pesci sani; tuttavia le cattive condizioni ambientali ed i fattori di stress possono contribuire a trasformare questi organismi da innocui saprofiti a patogeni.

Nel corso dell'estate 2003 si è verificato un primo episodio di Aeromonosi da *A. hydrophila* in un allevamento di *A. baeri*, ubicato nel nord Italia. A distanza di circa un anno, nell'agosto 2004, un secondo episodio si è riscontrato nello stesso allevamento, colpendo storioni adulti (2-4 kg), allevati all'interno di vasche in cemento, dotate di ossigenazione automatica, con una temperatura dell'acqua attorno ai 22-25° C. Ad una prima osservazione esterna, i soggetti in vasca apparivano normali, presentando comunque segni di inappetenza ed una lieve ipermelanosi. L'indagine anatomopatologica sugli esemplari morti ha evidenziato lesioni cutanee in prossimità delle pinne pettorali e della regione perianale ed emorragie interne a livello epatico. L'esame colturale è stato condotto su rene, milza, fegato e gonadi mediante semina su terreni di primo isolamento. La successiva caratterizzazione biochimica, ha consentito di identificare il microrganismo oggetto di questo studio. L'approccio terapeutico si è basato sulla somministrazione mediante mangime medicato contenente flumequine al dosaggio di 12 mg/kg p.v. per 5 giorni. La mortalità giornaliera si è attestata attorno allo 0,2 %, perdurando però anche dopo il trattamento antibiotico, probabilmente a causa dell'insorgenza di fenomeni di anoressia nei soggetti colpiti. Entrambi gli episodi si sono risolti con il ripristino di condizioni ottimali di allevamento.

Pertanto, il mantenimento di idonee condizioni igieniche in allevamento, la riduzione della densità in vasca ed una corretta alimentazione, costituiscono parametri di primaria importanza ai fini di evitare l'instaurarsi di condizioni di stress per i pesci, favorevoli alla comparsa di patologie sostenute da germi opportunisti.

L'isolamento di *A. hydrophila* finora è stato associato ad infezioni in numerose specie ittiche, tra cui alcuni Acipenseridi, ma rappresenta la prima segnalazione sul territorio nazionale in storione siberiano.

## **FOCOLAIO DI FORUNCOLOSI IN SALMERINI (*SALVELINUS FONTINALIS*) CON PRESENZA DI PAPPILLOMI A LOCALIZZAZIONE VENTRALE**

Latini M., Agnetti F., Panzieri C., Cari R., Manuali E., Ghittino C.

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche; Centro di Acquacoltura e Ittiopatologia - Via Salvemini 1 - 06126 Perugia*

Il salmerino (*Salvelinus fontinalis*) è un salmonide alloctono acclimatatosi con alcune popolazioni lungo l'arco alpino e l'Appennino settentrionale. Il fatto di possedere carni molto delicate ha favorito l'affermarsi del suo allevamento in diverse zone d'Italia. La difficoltà maggiore nella produzione di questa specie è legata alla notevole recettività nei confronti della Foruncolosi da *Aeromonas salmonicida*; questa patologia, infatti, provoca perdite consistenti sia nel novellame, sia negli individui in fase di finissaggio. Viene qui riportato un focolaio di Foruncolosi, associata a papillomatosi, riscontrato in salmerini allevati intensivamente in Umbria.

Durante l'estate 2004, nell'impianto considerato, si è verificata una consistente moria di salmerini e trote fario (*Salmo trutta*) aventi varie pezzature, ma non di trote iridea (*Oncorhynchus mykiss*). I soggetti colpiti erano anoressici e letargici, e presentavano soffiusioni emorragiche cutanee e viscerali; l'esame colturale ha evidenziato una setticemia da *Aeromonas salmonicida*, che è stata controllata con la somministrazione di mangime medicato a base di flumechina. In due gruppi di salmerini della taglia di 200-250 g. e dell'età di circa due anni, sono state notate delle escrescenze cutanee sul ventre, presenti in circa il 20% dei soggetti. Tali lesioni apparivano come proliferazioni di tipo verrucoso, singole o plurime, a vari stadi di sviluppo (precoce, intermedio e tardivo).

Le analisi istologiche sono state effettuate tramite fissazione delle escrescenze in formalina, inclusione in paraffina, colorazione con Ematossilina-Eosina e PAS. La proliferazione delle cellule epiteliali dello strato basale è risultata particolarmente marcata nelle lesioni cosiddette intermedie e tardive, mostrandoti aspetti papillari supportati da stroma fibrovascolare di sostegno. Erano inoltre presenti numerose cellule di aspetto mucinoso, PAS positive. Non sono invece state notate figure mitotiche.

Le analisi virologiche, condotte su monostrati cellulari RTG-2 e CHSE-214 per escludere la presenza di Herpesvirus tipo II del salmone giapponese (*Oncorhynchus masou*), sono risultate negative. L'esame delle lesioni cutanee al microscopio elettronico, effettuate utilizzando la tecnica dell'esame a fresco mediante flottazione e colorazione con acido fosfotungstico (PTA), non ha evidenziato presenza di particelle virali.

L'origine della formazione papillomatosa, escludendo noxe infettive e parassitarie (assenza di cercarie), è probabilmente da ricercare in cause traumatiche. L'alta prevalenza delle lesioni ha comportato un certo danno economico, per l'aspetto ripugnante conferito al pesce.

## **PLESIOMONAS SHIGELLOIDES COME CAUSA DI MORTALITA': PROVE SPERIMENTALI D'INFEZIONE IN GURAMI (*HELOSTOMA TEMMINCKII*) D'ACQUARIO**

Brunetti R., Amato G.\*, Colussi S., Pavoletti E., Brusa F., Prearo M.

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Via Bologna 148, 10154 Torino; \* C.I.A. Centro Internazionale Acquari, Strada del Francese 97/2C, 10100 Torino.*

*Plesiomonas shigelloides* è un germe Gram negativo, a forma bastoncellare, comunemente isolato dall'acqua e presente normalmente nel tratto intestinale in diversi animali a sangue freddo, inclusi i pesci d'acqua dolce ed i crostacei. Si tratta di un batterio mobile, asporigeno, anaerobio facoltativo, che cresce sia a 22° che a 37° C ed è ossidasi positivo. Nel Bergey's Manual of Determinative Bacteriology il genere *Plesiomonas* viene ancora incluso nella famiglia delle *Vibrionaceae*. Studi molecolari hanno però recentemente dimostrato che tale genere è genotipicamente più vicino al genere *Proteus*, appartenente alla famiglia delle *Enterobacteriaceae*. *P. shigelloides* può essere causa di gastroenteriti nell'uomo, ma anche di sepsi, meningiti neonatali e di altre infezioni extraintestinali quali colecistiti, ascessi al pancreas, osteomieliti e poliartriti. È stato isolato in diversi pesci, quali carpa, luccio e numerose specie d'acquario; i sintomi maggiormente evidenziabili sono arrossamento dell'addome e delle pinne; inoltre si può osservare enterite emorragico-catarrale, dilatazione della cistifellea e petecchie emorragiche a livello muscolare. In letteratura sono riportati casi di epidemie in trote iridea d'allevamento. Dopo un recente caso di elevata mortalità rinvenuta in un allevamento di Ciprinidi ornamentali, in cui si è potuto isolare *P. shigelloides* associato ad una grave infestazione da *Dactylogyrus* spp., si è cercato di valutare il possibile ruolo di tale germe come patogeno. Scopo di questo lavoro è stato quello di osservare l'eventuale quadro sintomatologico ed anatomopatologico causato dall'inoculazione intraperitoneale di ceppi di campo e di referenza di *P. shigelloides* in *Helostoma temminckii*. L'*H. temminckii*, conosciuto con il nome di "gurami del bacio", appartiene alla famiglia degli *Anabantidae*, sottofamiglia *Helostomatidae*. Questa specie è originaria dell'Indonesia e della Thailandia ed in acquario non supera i 13-14 cm; è stata utilizzata per la presente indagine, in quanto è resistente alle manipolazioni ed agli stress ambientali, presenta una taglia adeguata per le operazioni di inoculo ed è facilmente reperibile sul mercato. Nel corso dell'estate 2004 sono stati inoculati 20 pesci, suddivisi in 4 lotti da 5 individui ciascuno, con due ceppi di *P. shigelloides*, di cui uno proveniente dalla collezione DSMZ (DSM 8224) e un ceppo di campo. Sono stati inoculati 0,1 ml/pesce di soluzione batterica contenente  $10^8$  e  $10^7$  UFC/ml; inoltre 5 pesci inoculati con soluzione fisiologica, sono stati inclusi nel lotto di controllo negativo. I pesci sono stati controllati giornalmente per diciotto giorni. Dopo 9 giorni dall'inoculazione è deceduto un soggetto nel lotto inoculato con il ceppo di campo alla concentrazione più elevata, dimostrando nei giorni precedenti, segni di letargia. Il pesce è stato sottoposto ad esame anatomopatologico e colturale, evidenziando la presenza di un'enterite emorragica; l'esame colturale è risultato positivo per *P. shigelloides*. Tutti gli altri soggetti, non hanno presentato alcuna sintomatologia. Dopo avere proceduto alla soppressione degli altri soggetti, avvenuta al diciottesimo giorno p.i., non si sono riscontrate lesioni a carico degli organi interni. Non è stato quindi possibile, alla luce di tali risultati, poter stabilire la reale patogenicità di tale germe in assenza di fenomeni concomitanti di stress. E' quindi necessario procedere ad ulteriori studi sulla valenza patogena di *P. shigelloides*, valutando anche l'utilizzo di dosi infettanti superiori a quelle utilizzate e di specie ittiche diverse da quella testata.



## INDAGINE SULLA PREVALENZA DI *VIBRIO* PATOGENI NEI PRODOTTI DELLA PESCA E DELL'ACQUACOLTURA

Masini L., Ottaviani D., Bacchiocchi S., Santarelli S., Bacchiocchi I., Agnetti F., Ghittino C.

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Centro di Referenza Nazionale per il Controllo Microbiologico e Chimico dei Molluschi Bivalvi Vivi (CEREM) - Ancona*

Il ruolo svolto da *Vibrio cholerae* e *V. parahaemolyticus* nel determinismo delle patologie gastroenteriche legate al consumo di prodotti ittici è ampiamente documentato, mentre sono rare le segnalazioni di tossinfezioni alimentari riconducibili ad altri vibrioni alofili. Esistono tuttavia numerose prove indirette che fanno supporre il ruolo attivo di questi microrganismi nelle infezioni intestinali, quali la loro presenza in individui con diarrea, il frequente ritrovamento negli alimenti ittici, la tossicità dei ceppi isolati. Recenti studi molecolari hanno permesso di individuare, nell'ambito del genere *Vibrio*, numerose specie geneticamente distinte e difficilmente discriminabili su base biochimica, la cui esatta patogenicità è ancora da chiarire.

Gli obiettivi di questa indagine sono stati quelli di valutare la prevalenza di *Vibrio* spp. in pesci e molluschi marini, applicare innovativi protocolli di identificazione, determinarne la potenziale patogenicità. La ricerca è stata condotta nel biennio 2001-2003 su un totale di 250 campioni di alimenti ittici, tra cui i seguenti prodotti della pesca e d'acquacoltura: cozze (50 campioni) e vongole (50 campioni) provenienti da banchi marini naturali, seppie (50 campioni) e teleostei (50 campioni) pescati, spigole (25 campioni) ed orate (25 campioni) d'allevamento. La ricerca di *Vibrio* spp. è stata eseguita mediante arricchimento in acqua peptonata alcalina contenente l'1% di NaCl e successiva semina su terreno selettivo (TCBS agar). Per l'identificazione è stato applicato un sistema biochimico standardizzato, in grado di discriminare le 37 specie di *Vibrio* fino ad oggi note. Per valutarne la patogenicità, sono state testate la virulenza generale, mediante inoculo via i.p. nel topo, e l'enterotossicità, mediante test del topino lattante. Sui ceppi di *V. parahaemolyticus* è stata inoltre valutata l'emolisi su Wagatsuma agar, correlata con l'espressione della tossina TDH, e l'attività ureasica, correlata con la tossina TRH.

Su 250 campioni analizzati, 140 (56%) sono risultati contaminati da *Vibrio* spp. Le cozze si sono rivelate la matrice più a rischio, con 40 campioni (80%) positivi. Il protocollo classificativo utilizzato ha permesso di pervenire in tutti i casi ad una identificazione di specie. Accanto ai vibrioni classici, quali *V. alginolyticus* (50%), *V. parahaemolyticus* (35%), *V. cholerae* non 01 (10%) e *V. vulnificus* (10%), sono stati identificati vibrioni minori che non sarebbe stato possibile discriminare ricorrendo ai kit miniaturizzati del commercio, quali *V. cincinnatiensis*, *V. orientalis*, *V. mediterranei*, *V. fluvialis*, *V. harveyi*. Il 70% dei ceppi isolati ha provocato virulenza generale nel topo, ma solo il 10% contemporanea enterotossicità. Tale patogenicità è apparsa ceppo specifica, variabile tra microrganismi appartenenti alla stessa specie. Tra i 49 isolati di *V. parahaemolyticus*, due sono risultati emolitici ed un terzo dotato di attività ureasica, tutti provenienti da cozze. Questo dato conferma come, oltre agli isolati clinici, anche i ceppi ambientali di *V. parahaemolyticus* siano in grado di elaborare tossine TDH e TRH.

## STUDIO DEL FENOMENO DELL'ANTIBIOTICO-RESISTENZA IN CEPPI BATTERICI ISOLATI DA PESCI MARINI

Manfrin A.<sup>1</sup>, Tiozzo K.<sup>2</sup>, Franceschin I.<sup>1</sup>, Selli L.<sup>1</sup>, Bovo G.<sup>1</sup>, Qualtieri K.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Viale dell'Università, 11 – 35020 Legnaro (PD); <sup>2</sup>Università degli Studi di Padova - Facoltà di Scienze MM. FF. NN

Nel presente studio sono stati presi in esame 40 ceppi batterici, 10 per ciascuna differente specie, scelti sia per le loro intrinseche capacità patogene (*Vibrio alginolyticus*, *V. anguillarum* O1 e *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*) sia in base al loro frequente isolamento nelle specie marine allevate (*Vibrio fluvialis*), isolati tra il 1999 e il 2003 presso il Laboratorio di Ittiopatologia dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie. Tutti i ceppi provenivano da soggetti esaminati a seguito di episodi di malattia (24 branzini, 1 cefalo, 5 orate, 4 sogliole) ed avevano presentato, durante i test di sensibilità effettuati con la tecnica della diffusione in agar (Kirby-Bauer), elevate percentuali di resistenza ad alcuni dei chemioterapici utilizzati (Amoxicillina e Tetracicline). Tali ceppi sono quindi stati sottoposti a delle prove di valutazione in micrometodo della Minima Concentrazione Inibente (Minimal Inhibitory Concentration o M.I.C) utilizzando delle piastre a 96 pozzetti e testando 5 diversi antibiotici: amoxicillina (AML); doxiciclina (DX); ossitetraciclina (OT); florfenicolo (FFC); flumechina (UB). Per ognuno di questi antibiotici sono state predisposte delle diluizioni scalari con concentrazioni di 80 – 40 – 20 – 10 – 5 - 2,5 - 1,25 - 0,625 e 0,312 µg/mL usando come terreno di coltura Muller Hinton Broth (MHB) addizionato con l' 1,5 % di NaCl.

Le specie che hanno dimostrato la maggior resistenza nei confronti di amoxicillina sono risultate essere *V. anguillarum* e *V. alginolyticus* e, in misura molto minore, *V. fluvialis*. Queste tre specie di microrganismi sono invece risultate molto sensibili agli altri chemioterapici. *P. damsela* subsp. *piscicida* invece, è risultato sensibile all'amoxicillina e relativamente resistente all'ossitetraciclina. In generale, quindi, le MIC sono risultate sempre molto basse e per la maggior parte dei ceppi patogeni testati, quindi, non si sono riscontrati fenomeni particolari di resistenza, a parte il caso dell'amoxicillina che però può essere definita come una resistenza di tipo fisiologico, in quanto le penicilline sono scarsamente efficaci nei confronti dei vibrioni. Nonostante si trattasse di animali provenienti da allevamenti con episodi clinici in atto e spesso già trattati con antibiotici, la bassa percentuale di antibiotico resistenza riscontrata ci permette di ipotizzare che tale fenomeno nei patogeni marini non sia ancora così drammatico come per altri microrganismi, ad esempio *Aeromonas* spp. Inoltre, il fatto che *V. fluvialis*, comunemente ritenuto un microrganismo ambientale, non abbia manifestato evidenti fenomeni di resistenza, potrebbe essere un indice del fatto che l'impatto della terapia antibiotica in ambiente marino sia ancora contenuto.

Tali ipotesi dovranno essere in futuro supportate da ulteriori indagini, sia aumentando il numero dei ceppi testati, sia ampliando il range delle diluizioni e il numero dei principi attivi da testare.

## INFEZIONE SPERIMENTALE DA *CITROBACTER FREUNDII* IN PESCI ROSSI (*CARASSIUS AURATUS*) D'ACQUARIO

Prearo M., Brunetti R., Arsieni P., Locatelli L., Prearo D., Amato G.\*

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Via Bologna 148, 10154 Torino; \* C.I.A. Centro Internazionale Acquari, Strada del Francese 97/2C, 10100 Torino*

*Citrobacter freundii* è germe Gram negativo appartenente alla famiglia delle *Enterobacteriaceae*. È mobile a 25° C, ossidasi negativo e catalasi positivo; presenta una resistenza ai farmaci beta-lattamici incluse le cefalosporine di III generazione, per la produzione di una  $\beta$ -lattamasi. È considerato un patogeno opportunista: può essere la causa di forme enteriche e di infezioni meningee nell'uomo. Inoltre, può essere responsabile di una grande varietà di infezioni nosocomiali, soprattutto a livello degli apparati urinario e respiratorio. Viene sempre più frequentemente segnalato come possibile patogeno in diverse specie ittiche, dove il suo isolamento è associato a problemi di stress ambientale, come alti livelli di inquinamento. È stato segnalato come causa di mortalità in trotelle iridea e in carpette. Viene isolato sempre più frequentemente in pesci ornamentali, dove può causare inappetenza, forme enteriche e alta mortalità, soprattutto nelle forme giovanili. Nelle varie indagini condotte dal Laboratorio di Ittiopatologia dell'Istituto Zooprofilattico del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta di Torino, nel corso degli ultimi tre anni, è stato isolato più volte da pesci d'acquario come *Carassius auratus*, *Carnegiella strigata*, *Crenicara punctulata*, *Moenkhausia pittieri* e *Pterophyllum scalare*. Per questo studio sperimentale è stata scelta una specie molto comune, il *Carassius auratus*, ciprinide mediamente resistente agli agenti stressanti. Scopo di questo lavoro è quello di osservare il quadro anatomopatologico causato dall'inoculazione di ceppi di campo e di riferimento di *C. freundii* in pesce rosso e le lesioni riscontrate. Nel corso dell'estate 2004 sono stati inoculati 20 pesci rossi, suddivisi in 4 lotti da 5 individui ciascuno, con due ceppi di *C. freundii* di cui uno proveniente dalla collezione DSMZ (DSM 30039) e un ceppo di campo. Sono stati inoculati 0,2 ml/pesce di soluzione batterica contenente  $10^8$  e  $10^6$  UFC/ml; inoltre 5 pesci inoculati con soluzione fisiologica, sono stati inclusi nel lotto di controllo negativo. I pesci sono stati controllati giornalmente per dieci giorni; i soggetti deceduti sono stati sottoposti ad esame anatomopatologico e colturale. I sopravvissuti sono stati sacrificati e sottoposti agli esami di routine. Il *C. freundii* è stato isolato da tutti i soggetti morti; sono giunti a morte 8 pesci su 20 inoculati (40%); la comparsa dei primi sintomi, rappresentati da emorragie cutanee, è avvenuta dopo circa 48 ore p.i.; all'esame anatomopatologico si sono potute rilevare emorragie interne, presenza di liquido ascitico nella cavità peritoneale e gastro-enterite. Tutti i pesci successivamente soppressi non presentavano lesioni evidenti, tranne che per scarse emorragie cutanee in 3 esemplari. Al tavolo necroscopico si poteva notare la presenza di rare emorragie viscerali ed enterite in alcuni soggetti. Il lotto in cui si è avuta la percentuale maggiore di mortalità è stato quello inoculato con il ceppo di riferimento alla concentrazione maggiore (4 soggetti su 5); in entrambi i lotti inoculati con il ceppo di campo si è avuta invece una mortalità di 2 soggetti. Con questo lavoro si è dimostrata sperimentalmente l'infezione da *C. freundii* in *Carassius auratus* con fenomeni sintomatologici e rilievi anatomopatologici evidenti, sovrapponibili a quanto descritto in letteratura per altre specie ittiche. *C. freundii* può essere quindi annoverato tra i possibili patogeni per i pesci ornamentali, soprattutto se stabulati in condizioni precarie e che hanno subito forti stress. Resta da valutare la reale patogenicità in pesci allevati per scopo alimentare o nell'acque libere.

**NEFRITE BATTERICA DA *RENIBACTERIUM SALMONINARUM* (BKD):  
DESCRIZIONE DI UN FOCOLAIO IN TROTA LACUSTRE (*SALMO TRUTTA  
LACUSTRIS*)**

Salogni C., Zanoni M.G., Mangiarotti A., Alborali L.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, Via A. Bianchi, 7 – 25100 Brescia

La BKD è una malattia batterica dei salmonidi ad andamento tipicamente cronico, caratterizzata da una netta proliferazione del rene posteriore. La patologia è stata descritta sul territorio nazionale nel 1984 e poi solo sporadicamente segnalata.

La BKD costituisce un serio pericolo per le popolazioni di salmonidi autoctone viventi nelle acque pubbliche che, a seguito dell'immissione di soggetti infetti, potrebbero contrarre l'infezione trasmettendola successivamente verticalmente alla progenie.

Nella primavera del 2004 in una piscicoltura della pianura lombarda si è verificato un episodio di mortalità in una partita di trote lacustri recentemente introdotte da un'altra azienda. Nell'allevamento in questione erano presenti trote iridee allevate in vasche alimentate con acqua di fiume, mentre le trote lacustri venivano stabulate separatamente in vasche di cemento alimentate con acqua di pozzo. La mortalità, con andamento variabile, si è protratta per alcune settimane. La sintomatologia era caratterizzata da: apatia, inappetenza, modico esoftalmo e distensione addominale. Le lesioni anatomopatologiche riscontrate erano date da: anemia, proliferazione di vario grado del rene posteriore con presenza di noduli biancastri di dimensioni variabili da pochi millimetri a mezzo centimetro. Tali noduli erano rilevabili, in alcuni soggetti, anche a livello epatico.

L'infezione da *Renibacterium salmoninarum* è stata confermata tramite il test d'immunofluorescenza indiretta su sezione d'organo con siero policlonale e successivamente confermata con esame colturale, tipizzazione biochimica e sierologica.

La terapia effettuata con mangime medicato ha permesso il controllo della malattia e la riduzione della mortalità.

## UTILIZZO DI VACCINI CON ADJUVANTE OLEOSO NEI CONFRONTI DELLA LATTOCOCCOSI DELLA TROTA IRIDEA (*ONCORHYNCHUS MYKISS*).

Manfrin A., Volpin M., Borghesan F., Tonon P., Rampazzo E., Selli L., Bovo G., Qualtieri K.

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Viale dell'Università, 11 – 35020 Legnaro (PD)*

Negli ultimi anni l'inasprirsi della Lattococcosi ha indotto numerosi ricercatori, sia a livello nazionale che internazionale, ad effettuare prove sperimentali e di campo per testare l'efficacia di diverse formulazioni vaccinali nei confronti di tale patologia. L'utilizzo di vaccini privi di adjuvante ha dato scarsi risultati in termini di durata della protezione, mentre gli adjuvanti minerali utilizzati di solito hanno creato problemi collaterali, caratterizzati da reazioni infiammatorie a livello peritoneale e fenomeni di aderenza fibrinosa. Nell'ambito di un progetto finanziato dalla Regione Veneto sono stati testati degli adjuvanti, minerali (ISA 50 V<sup>®</sup>) e non minerali (ISA 563 VG<sup>®</sup> e ISA 763 AVG<sup>®</sup>) associati ad un vaccino stabulogeno ottenuto mediante inattivazione con formalina allo 0.3 % di ceppi di *Lactococcus garvieae* (bacterin) isolati nell'ambito di focolai della malattia da trote iridee (*Oncorhynchus mykiss*). Dopo aver testato la tossicità acuta e cronica in topini di 20 g., i due adjuvanti (ISA 563 VG<sup>®</sup> e ISA 763 AVG<sup>®</sup>) sono stati somministrati per via intra-peritoneale a gruppi di 25 trote di 50-60 g., stabulate presso l'acquario sperimentale dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, sia singolarmente sia in associazione al bacterin.

Dopo 10 settimane gli animali sono stati sottoposti a challenge mediante inoculazione i.p. di 0.1 ml di una sospensione di *L. garvieae* avente titolo di 10<sup>5</sup> ufc/mL. Gli animali sono stati seguiti per 30 gg. e sono state determinate la mortalità cumulativa giornaliera e la RPS (Relative Per cent Survival). In parallelo, presso un allevamento situato nella regione Veneto, sono stati trattati con due differenti vaccini addizionati con adjuvante (ISA 763 AVG<sup>®</sup> e ISA 50 V<sup>®</sup>) due gruppi di 10.000 trote del peso medio di 170±20 g. Tali animali sono stati controllati per 6 mesi registrando la mortalità giornaliera e prelevando mensilmente il siero da 30 soggetti per gruppo al fine di determinarne il titolo anticorpale mediante sieroaagglutinazione lenta in piastra.

Nessuno degli adjuvanti è risultato tossico o ha determinato lesioni significative a livello di cavità addominale nei topi. Nelle trote si è evidenziata macroscopicamente una modesta reattività peritoneale e tracce dell'adjuvante ISA 563 VG<sup>®</sup> anche a distanza di 3 mesi, mentre solo in alcuni soggetti trattati con ISA 763 AVG<sup>®</sup> istologicamente è stata evidenziata un'iperemia viscerale e una modesta infiltrazione linfocitaria a livello epatico. Nella prova in acquario gli animali trattati con il vaccino addizionato con ISA 763 AVG<sup>®</sup> hanno dimostrato una minore mortalità cumulativa giornaliera e una migliore RPS (72.7 %) rispetto a quelli vaccinati solo con il bacterin (64 %) o con l'altro tipo di adjuvante (62.5 %).

Anche nella prova di campo, inoltre, gli animali in cui è stato utilizzato l'adjuvante ISA 763 AVG<sup>®</sup> hanno avuto una mortalità finale inferiore a quella dei soggetti trattati con ISA 50 V<sup>®</sup>. Dai risultati ottenuti, si può senz'altro confermare la maggiore efficacia e durata nel tempo del vaccino con adjuvante e la minor capacità irritante dell'adjuvante oleoso non minerale. A tal riguardo, trattandosi di un prodotto più costoso, andranno fatte ulteriori prove su un numero maggiore di animali per valutare correttamente il rapporto costi/benefici di un ipotetica profilassi vaccinale di massa.

## APPROCCIO ALLA VACCINAZIONE ORALE CONTRO LA LATTOCOCCOSI

Gusmani L.<sup>1</sup>, Buonasera E.<sup>1</sup>, Edalucci M.<sup>1</sup>, Vojnovic D.<sup>2</sup>, Galeotti M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Università degli Studi di Udine, Facoltà di Medicina Veterinaria, Dipartimento di Scienze della Produzione Animale, Via delle Scienze, 206 – 33100 Udine;* <sup>2</sup> *Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Università degli Studi, Trieste*

La lattococcosi, malattia ad eziologia batterica causata da streptococchi appartenenti alla specie *Lactococcus garvieae*, è uno dei maggiori problemi nelle trottocolture durante il periodo estivo.

L'utilizzo di vaccini stabulogeni è difficilmente praticabile su larga scala sia per la ridotta finestra temporale che gli allevatori hanno a disposizione prima che si creino in campo le condizioni per la comparsa dei primi episodi, sia per il tipo di somministrazione, per inoculo intraperitoneale, che trova molti contrari alla manipolazione dei pesci.

Lo scopo di queste sperimentazioni è stato valutare se fosse praticabile la via di somministrazione orale del vaccino. La formulazione vaccinale utilizzata è costituita da cellule batteriche inattivate con formalina e liofilizzate. Il vaccino è stato in seguito mescolato ad ingredienti commerciali per la produzione di mangime.

La stessa formulazione vaccinale precedentemente descritta è stata impiegata per sperimentare la possibilità di prolungare la stimolazione del sistema immunitario con un rilascio controllato dell'antigene, nello stesso tempo proteggendolo dall'azione dei succhi gastrici. A questo scopo sono state provate alcune sostanze già sperimentate anche in ambito acquacolturale per l'incapsulazione di molecole da somministrare oralmente a pesci. Le metodiche specificamente impiegate per i polimeri considerati sono state utilizzate per la produzione di microcapsule per la veicolazione del vaccino.

Il mangime addizionato con vaccino costituito da cellule formolate e le preparazioni mangimistiche contenenti vaccino incapsulato in materiali gastro-resistenti sono stati somministrati a gruppi di trote iridee stabulate in acquari sperimentali.

Il transito dell'antigene nel tratto digerente dei pesci è stato seguito mediante indagine immunoistochimica, mentre il comportamento delle microcapsule è stato valutato mediante la marcatura con fluoresceina.

I risultati di questa sperimentazione sono costituiti da valutazioni del titolo anticorpale specifico eseguite nei sieri dei soggetti trattati nel corso della vaccinazione. Inoltre sono state allestite prove di infezione sperimentale allo scopo di valutare l'andamento dell'infezione in pesci vaccinati oralmente.

**PROVE PRELIMINARI DI M.I.C. (MINIMAL INHIBITORY CONCENTRATION)  
NEI CONFRONTI DI *LACTOCOCCUS GARVIEAE***

Manfrin A., Volpin M., Selli L., Bovo G., Qualtieri K.

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

Nel presente studio sono stati presi in esame 50 ceppi di *Lactococcus garvieae*, isolati tra il 1993 e il 2004 presso il Laboratorio Ittiopatologia dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, da trote iridee (*Oncorhynchus mykiss*). Le MIC sono state effettuate utilizzando delle piastre a 96 pozzetti con fondo a U (Trek Diagnostic Systems Ltd - modello CMV1BAVF. Lotto n° B2434)® nei quali erano distribuiti 18 antibiotici in forma disidratata e a concentrazioni scalari 1: 2 secondo il seguente schema :

Antibiotico	Classe	Sigla	µg/ml	Posiz
Enrofloxacin	Fluorochinoloni	ENRO	2 - 0.12	A 1 - 5
Gentamicina	Aminoglicosidi	GEN	8 - 0.5	B 1 - 5
Ceftiofur	Cefalosporine	XNL	4 - 0.25	C 1 - 5
Neomicina	Aminoglicosidi	NEO	32 - 2	D 1 - 5
Eritromicina	Macrolidi	ERY	4 - 0.12	E 1 - 6
Ossitetraciclina	Tetracicline	OXY	8 - 0.25	F 1 - 6
Tetraciclina	Tetracicline	TET	8 - 0.25	G 1 - 6
Amoxicillina	β - Lattamine	AMX	16 - 0.25	H 1 - 7
Spectinomomicina	Aminoglicosidi	SPE	64 - 8	6 A - D
Sulfadimetossina	Sulfamidici	SDM	256 - 32	7 A - D
Sulfametoxazolo + Trimethoprim	Sulfamidici	SXT	2/38 0.5/9.5	7 E - G
Sarafloxacin	Fluorochinoloni	SAR	0.25 - 0.03	8 A - D
Sulfatiazolo	Sulfamidici	STZ	256 - 32	8 E - H
Penicillina	β - Lattamine	PEN	8 - 0.06	9 A - H
Streptomicina	Aminoglicosidi	STR	1024 - 8	10 A - H
Novobiocina	--	NOV	4 - 0.5	11 A - D
Tilosina tartrata	Macrolidi	TYL	20 - 2.5	11 E - H
Clindamicina	Lincosamidi	CLI	4 - 0.25	12 A - E

Diversi ceppi si sono dimostrati costantemente resistenti ai tre sulfamidici (Sulfadimetossina, Sulfatiazolo e Sulfametoxazolo + Trimethoprim), alla Clindamicina e alla Sarafloxacin mentre con l'Enrofloxacin si è riusciti ad ottenere una MIC 80% e 50% nel range delle diluizioni provate. Per quanto riguarda Gentamicina, Neomicina, Streptomicina, Tilosina e Novobiocina non è stato possibile trovare una MIC, anche se è ipotizzabile che a concentrazioni superiori possa essere determinata. Buoni i valori dell'Eritromicina, in quanto in vitro non paiono apparire segni di resistenza. Le Tetracicline hanno dimostrato una uniforme e apprezzabile regressione lineare, ma anche per esse la MIC<sub>90</sub> è stata ottenuta a valori estremamente alti (8 µg/mL) consentendoci di ipotizzare che la resistenza a tali molecole, segnalata più volte dai colleghi che operano in azienda, sia ormai una realtà inconfutabile. Quella dei beta-lattamici è la classe che ha dato risultati più omogenei e convincenti. Il buon esito in vitro della Amoxicillina, però, non pare essere confermato da un altrettanto valido riscontro in campo. Anche la Penicillina e il Ceftiofur hanno dato buoni risultati; non sono pensabili, però, sviluppi nel loro utilizzo visto che esistono solo formulazioni di tipo iniettabile.

## MICOBATTERIOSI DEL BRANZINO IN UN MODELLO SPERIMENTALE “PER IMMERSIONE”

Sarli G., Zanoni R.G., Morandi F., Fioravanti M.L., Florio D., Mandrioli L., Brunetti B., Prearo M.\*

*Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale, Ozzano Emilia (BO); \* Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino*

Le micobatteriosi ittiche, già note in natura, sono patologie studiate sempre più di frequente sia per le problematiche legate all'allevamento intensivo, sia per le eventuali potenzialità zoonosiche. Modelli sperimentali, che prevedevano una inoculazione (peritoneale o muscolare), sono stati riprodotti in diversi teleostei, con specie differenti di batteri appartenenti al genere *Mycobacterium*. In base a risultati precedenti (Sarli et al., Atti APIV 2003) è stato creato un modello di infezione “per immersione” in branzini utilizzando il *M. fortuitum*, allo scopo di valutare l'insorgenza delle lesioni precoci ed individuare la più probabile via di entrata, fornendo così nuove conoscenze alla patogenesi della malattia. Due gruppi di 60 branzini di 10g sono stati tenuti immersi, per due ore, in due sospensioni di *M. fortuitum* contenenti rispettivamente  $10^2$  germi/ml e  $10^5$  germi/ml. Un terzo gruppo, sempre di 60 soggetti, è stato utilizzato come controllo negativo. Tre soggetti per ogni gruppo sono stati prelevati a 16 e 24 ore p.i., quindi giornalmente per i successivi 6 giorni e settimanalmente per 9 settimane. Dei tre soggetti, previamente sottoposti ad eutanasia, due venivano fissati *in toto* in formalina tamponata 10% ed uno utilizzato per reisolare il ceppo batterico impiegato per l'infezione. Per l'esame istologico sono stati campionati: occhio, branchie, stomaco, intestino anteriore e posteriore, cute (linea laterale anteriormente alla pinna caudale), milza, rene anteriore, fegato, peritoneo. Sezioni istologiche seriate sono state impiegate per la colorazione ematossilina-eosina e Ziehl-Neelsen. L'esame batteriologico, negativo in tutti i soggetti del gruppo di controllo, è risultato positivo nei soggetti “esposti” solo dalla quarta settimana p.i. Sono stati sottoposti ad esame istologico complessivamente gli organi di 47 soggetti (9 controlli e 38 esposti). Nei soggetti di controllo era presente solamente una statosi epatica, da lieve e focale a diffusa e grave, peraltro riscontrata anche nei soggetti esposti. In questi ultimi la lesione elementare rilevata era un granuloma, da singolo e focale a multiplo e confluyente, caratterizzato dall'accumulo di aggregati nodulari di istiociti e rari linfociti alla periferia (grado 1, prevalentemente ad 1 settimana p.i.). Con la progressione del granuloma iniziava a comparire la necrosi di singole cellule (grado 2, prevalentemente a 2 settimane p.i.) o era evidente un centro necrotico del granuloma (grado 3, prevalentemente dopo la terza settimana p.i.). Lesioni granulomatose specifiche con presenza di acido-resistenti sono state riscontrate, in ordine di frequenza decrescente, nella milza, rene anteriore, branchie, fegato, peritoneo. Nella milza in 15 casi su 38 era presente iperplasia dei centri melanomacrofagici (6 casi) e/o lesioni granulomatose (10 casi). Nel rene anteriore vi era iperplasia dei centri melanomacrofagici (1 caso) o granulomi (7 casi). Nelle branchie (8 casi) erano riscontrabili lesioni focali di branchite a livello di lamelle secondarie, caratterizzate da iperplasia delle cellule epiteliali, accumulo di monociti e presenza di rari acido-resistenti a livello intracellulare. Alla base delle lamelle primarie, nello stroma dell'arco branchiale, erano reperibili le tipiche lesioni granulomatose. Granulomi a livello epatico sono stati osservati in 4 casi, mentre, su 5 casi di reazione peritoneale, essa era riconducibile alla variante granulomatosa in 2 casi ed a una peritonite acuta iniziale in 3 casi. Alla luce dei risultati ottenuti si enfatizza la riproduzione sperimentale della malattia con un modello mai utilizzato in letteratura e, si sottolinea, tra le vie di entrata valutate su base istologica, quella branchiale come la più verosimile in base alla frequenza delle lesioni riscontrate.



## INDAGINE SULLA DIFFUSIONE DI *MYCOBACTERIUM* SPP. IN ALLEVAMENTI NAZIONALI DI PESCE ROSSO (*CARASSIUS AURATUS*)

Prearo M., Florio D.\*, Marcer F.\*, Fioravanti M.L.\*, Campo Dall'Orto B., Zanoni R.G.\*

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Via Bologna 148 – 10154 Torino; <sup>1)</sup> Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinarie e Patologia Animale, Via Tolara di Sopra, 50 – 40064 Ozzano Emilia (BO)*

In Italia l'allevamento del pesce rosso (*Carassius auratus*), condotto tradizionalmente in sistemi estensivi o semi-intensivi, ha conosciuto un notevole impulso produttivo mediante l'utilizzo di tecniche tipicamente intensive, raggiungendo delle produzioni stimate di oltre 25 milioni di soggetti all'anno. Fra i fattori di rischio sanitario di maggior importanza nei pesci ornamentali vanno annoverate le micobatteriosi, patologie batteriche sostenute da numerose specie di *Mycobacterium*, caratterizzate da un andamento cronico e fortemente debilitanti. In Italia non sono stati fino ad ora descritti casi di micobatteriosi ittica in pesci ornamentali d'allevamento, sebbene risultino frequentemente segnalati in specie ittiche ornamentali provenienti da acquari privati o da partite d'importazione. Nell'ambito di ricerche volte allo studio dello stato sanitario di pesci rossi allevati in Italia, si è quindi condotta un'indagine conoscitiva sulla diffusione delle micobatteriosi in questa specie ittica.

Nel corso di indagini sanitarie effettuate presso 15 allevamenti nazionali di pesce rosso (*Carassius auratus*) nel periodo compreso tra gennaio 2000 e dicembre 2003, sono stati campionati 2400 soggetti. Da ogni singolo allevamento venivano prelevati circa 40 soggetti ogni anno. Tutti i pesci venivano sottoposti ad esame autoptico, al fine di rilevare l'eventuale presenza di lesioni riconducibili a micobatteriosi, allestite impronte da organi e colorate con la metodica di Ziehl-Neelsen (Z-N) per evidenziare la presenza di bacilli acido-alcool resistenti. Su tutti i soggetti è stato condotto successivamente l'esame colturale su terreni selettivi, finalizzato all'isolamento di micobatteri, ed incubati a  $30^{\circ} \text{C} \pm 1$  per un periodo non inferiore a 60 giorni. Tutte le colonie ascrivibili a micobatteri sono state sottoposte a prove fenotipiche e biochimiche per l'identificazione di specie. Infine, dagli stessi soggetti porzioni di rene, fegato e milza venivano fissati in formalina tamponata al 10% e sottoposti all'esame istologico utilizzando le colorazioni ematossilina-eosina e Ziehl-Neelsen.

Nel corso della ricerca sono state individuate positività per micobatteri in tre allevamenti dei 15 sottoposti ad indagine. In particolare, nel 2001 sono risultati positivi 20 esemplari provenienti da due diverse partite di un unico allevamento, dove è stato isolato da tutti gli esemplari *M. chelonae*. Nel 2002 è stata riscontrata una positività per *M. fortuitum* in 7 soggetti di un'unica partita prelevata presso un altro allevamento. Infine, nel 2003, in un terzo allevamento risultato positivo, è stato possibile isolare *M. marinum* da tre soggetti prelevati dalla stessa vasca. In tutti i soggetti risultati positivi all'esame colturale per micobatteri erano state osservate lesioni macroscopiche riconducibili a micobatteriosi, con noduli diffusi in tutti gli organi interni. All'esame istologico si evidenziava la presenza diffusa di granulomi a diverso stadio evolutivo, in cui erano frequentemente osservabili batteri acido-alcool resistenti. Tutti i soggetti risultati positivi erano di taglia superiore a 10 cm. Le partite positive per micobatteri sono state eliminate ed operazioni di disinfezione e vuoto sanitario sono state condotte sulle vasche di stabulazione. Le ricerche effettuate su altre partite provenienti dagli stessi allevamenti, hanno avuto sempre esito negativo, anche quando condotte in periodi successivi.

Il ritrovamento di positività per micobatteri in pesci ornamentali allevati in Italia mette in evidenza la crescente importanza sanitaria di questa patologia, fino ad oggi descritta solo in pesci ornamentali d'importazione. Nell'allevamento del pesce rosso, caratterizzato da un ambiente con scarsi ricambi idrici, elevata quantità di materiale organico e sovraffollamento, i micobatteri possono trovare ottimali condizioni di crescita, con insorgenza di patologie croniche in grado di causare elevate perdite produttive. Anche in considerazione del potenziale ruolo zoonosico di questi microrganismi appare quindi opportuno proseguire le ricerche relative alla loro presenza negli ambienti d'allevamento nazionali in modo da prevenirne la diffusione.

## **MYCOBACTERIUM SPP.: IDENTIFICAZIONE BIOCHIMICA VERSUS PCR-RFLP DEL GENE HSP65**

Campo Dall'Orto B.\*, Caffara M.°, Florio D.°, Prearo M.\*

\*Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino;  
°Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale, Università di Bologna

I Micobatteri, microrganismi ampiamente riconosciuti come patogeni per i pesci, causano una sindrome definita “tubercolosi ittica”, interessando specie ittiche, marine e dulciacquicole, ornamentali e per uso alimentare, sia selvatiche che allevate.

Queste infezioni, caratterizzate da un decorso cronico, sono particolarmente importanti e diffuse nei pesci ornamentali, a causa delle condizioni altamente stressanti alle quali sono sottoposti. L'identificazione di specie nella diagnosi di tubercolosi ittica è molto importante, in quanto delle oltre 50 specie del genere *Mycobacterium* numerose vivono in ambiente acquatico, anche se solo alcune sono state riconosciute patogene per i pesci e potenziali agenti zoonosici. Le tecniche d'identificazione tradizionali, basate sulle caratteristiche fenotipiche del germe, risultano particolarmente lunghe ed indaginose vista la complessità tassonomica di questo genere. A tal proposito si è voluto valutare l'utilità di affiancare alle tecniche fenotipiche classiche alcune metodiche molecolari. Nel corso del 2003 sono state eseguite indagini batteriologiche su 98 pesci ornamentali, 90 dulciacquicoli (22 specie) e 8 marini (8 specie), provenienti da acquari privati. Rene, milza e fegato di tutti i soggetti sono stati seminati su terreni selettivi secondo le tecniche standard. Le colonie isolate e risultate positive alla colorazione di Ziehl-Neelsen, sono state successivamente identificate attraverso i test fenotipici, eseguiti seguendo le indicazioni del CDC Manual (Kent & Kubica, 1985). Tutti i ceppi isolati ed identificati fenotipicamente, e 10 ceppi di riferimento (DSMZ), sono stati sottoposti ad analisi genotipica, al fine di confrontare l'efficacia dei due metodi. L'identificazione genotipica si è basata sull'analisi dei frammenti di restrizione ottenuti dall'esecuzione di PCR-RFLP di una porzione del gene *hsp65* (65-kDa heat shock protein gene), utilizzando i primer Tb11 e Tb12 come descritto da Telenti *et al.* (1993). La digestione dell'amplificato di 439 bp è stata condotta con l'impiego di due enzimi di restrizione (*BstEII* e *HaeIII*) (MBI Fermentas). I frammenti ottenuti sono stati separati mediante elettroforesi su gel di poliacrilamide 4-20% TBE. Il pattern di restrizione è stato analizzato mediante il software Quantity One 4.4.1 (Biorad, Richmond, CA), per determinare il numero ed il peso dei frammenti comparandolo con lo standard 100 bp DNA Ladder (O'RangeRuler, Fermentas). Dei 98 soggetti esaminati, 45 (46%) sono risultati positivi per *Mycobacterium* spp.: 42 (42.8%) soggetti tra le specie dulciacquicole e 3 (3%) marine. L'approccio polifasico ha permesso di identificare le seguenti specie: *M. marinum*, *M. chelonae*, *M. peregrinum*, *M. septicum*, *M. fortuitum*, *M. gordonae*, *M. kansasii*, *M. nonchromogenicum*, *M. abscessus*, *M. terrae*. Va comunque evidenziato come l'impiego della PCR-RFLP permetta di studiare e comprendere importanti relazioni tassonomiche del genere *Mycobacterium*, ed in particolare di discriminare tra specie strettamente correlate tra loro come ad esempio *M. fortuitum* complex (*M. peregrinum*, *M. fortuitum*), *M. chelone* complex (*M. chelone*, *M. abscessus*) e *M. terrae* complex (*M. triviale*, *M. terrae*, *M. nonchromogenicum*). I risultati di questo lavoro sottolineano l'importanza di un approccio polifasico per giungere ad una corretta identificazione di specie e poter descrivere nuove specie.

## EPISODIO DI NOCARDIOSI IN OMBRINE BOCCADORO (*ARGYROSOMUS REGIUS*) D'ALLEVAMENTO

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

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

*\*Dipartimento di Scienze degli Alimenti, Università di Bologna. \*\* Skretting Italia, Mozzecane (VR).*

L'ombrina boccadoro (*Argyrosomus regius*) rappresenta una specie ittica innovativa di grande interesse per la maricoltura nazionale in relazione alle ottime performance di crescita in allevamento (oltre 1500 g in un anno) ed all'elevato valore commerciale delle carni. Lo sfruttamento produttivo di questa specie nel nostro paese è recente e si basa essenzialmente sull'ingrasso di avannotti provenienti dall'estero. Il rischio di introduzione di patogeni nuovi per il territorio nazionale e quindi considerevole soprattutto in relazione alle scarse conoscenze sulle patologie più comuni in questa specie ittica. In seguito a ripetuti episodi di mortalità registrati da oltre 3 mesi in un allevamento intensivo di *A. regius*, nella primavera 2004 sono pervenuti in laboratorio alcuni soggetti (2,5 kg peso medio), a scopo diagnostico. Le osservazioni cliniche condotte sui soggetti colpiti riferivano di sintomatologia nervosa, con episodi di letargia e atassia natatoria, e presenza di estese lesioni cutanee. All'esame necroscopico si evidenziavano enucleazione del globo oculare, talvolta con processo di cicatrizzazione in corso, lesioni cutanee caratterizzate dalla contemporanea presenza di aree emorragiche, ulcere, o estese erosioni in cui erano presenti numerosi noduli bianco-giallastri. All'apertura della cavità corporea la presenza di noduli bianco-giallastri di varie dimensioni era rilevabile anche a carico di milza, rene e cuore. L'esame parassitologico ha dato sempre esito negativo. L'esame microscopico di preparati su vetrino allestiti da lesioni cutanee, rene e milza e colorati sia con Ziehl-Neelsen (ZN) classico che ZN modificato per *Nocardia* spp. in questi organi ha evidenziato la presenza di batteri ramificati acido resistenti solo con la seconda metodica. L'esame colturale per batteri condotto da rene, milza e cervello su Tryptic Soy Agar (TSA), TSA+2%NaCl, Brain Heart Infusion Agar (BHIA), Blood Agar (BA) e Löwenstein-Jensen, incubati a 25°C±1 e 30°C±1 fino a 2 mesi, ha permesso di isolare su TSA, TSA+2%NaCl, BHIA e BA colonie biancastre identificate mediante prove in macro e micrometodo come *Edwardsiella tarda* e su Löwenstein-Jensen, BA e BHI colonie bianco-giallastre positive alla colorazione di ZN modificata per *Nocardia* spp. Su questi ultimi isolati sono state eseguite prove di crescita su terreni selettivi e a diverse temperature, prove di resistenza al liozima, riduzione dei nitrati e utilizzo dell'urea. Per l'identificazione sono stati inoltre utilizzati i sistemi in micrometodo API 20E, 20C AUX e 50CH. Le caratteristiche fenotipiche ottenute hanno permesso di ascrivere il germe isolato al genere *Nocardia*. L'appartenenza a questo genere è stata confermata anche mediante PCR-RFLP di un frammento di 439 bp del gene *hsp65*. All'esame istologico, effettuato su porzioni di cute, branchie, milza, rene, fegato, cuore, cervello, occhio e gonadi con colorazione Ematossilina-Eosina, Ziehl-Neelsen (ZN) e metodo modificato di Fite Faraco per *Nocardia*, si osservavano focolai nodulari, purulenti, granulomatosi e disseminati nel derma, muscolo, rene, milza, cuore, testicolo e, meno frequentemente, nel tessuto epatopancreatico, la cui configurazione in termini di processo suppurativo o granulomatoso era differenziabile in rapporto alla fase acuta o cronica della lesione. A livello branchiale erano evidenti ascessi nei filamenti e batteri tra gli spazi interlamellari con infiltrazione granulocitari.

Il quadro sintomatologico, anatomopatologico e istologico riscontrato nei soggetti esaminati è risultato sovrapponibile a precedenti descrizioni di episodi di Nocardiosi in pesci marini osservati all'estero.

## ISOLAMENTO DI *TSUKAMURELLA PAUROMETABOLA* E *VIBRIO ALGINOLYTICUS* DA *HIPPOCAMPUS BARBOURI* (BARBOUR'S SEAHORSE) STABULATI IN ACQUARIO

Florio D., Marcer F., Fichtel L. \*, Quaglio F.\*\*, Fioravanti M.L.

*Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale, Università di Bologna, \* Parco Oltremare, Riccione \*\*Dipartimento di Scienze degli Alimenti, Università di Bologna*

Fra i “cavallucci marini” vengono comprese oltre 40 specie della famiglia Syngnathidae di grande interesse ornamentale. Benché le conoscenze relative alle loro esigenze nutrizionali, ambientali e gestionali siano state notevolmente incrementate negli ultimi anni, ancora scarse risultano essere quelle relative alle problematiche sanitarie che possono emergere in condizioni di stabulazione forzata in acquario. Nel maggio 2004 si è verificato un episodio di mortalità fra gli esemplari di *Hippocampus barbouri* ospitati presso un parco espositivo nazionale. I soggetti, importati dalle Filippine, durante il periodo di quarantena hanno presentato mortalità a stillo e comparsa di vaste aree di depigmentazione cutanea prevalentemente a carico della testa e della coda, talvolta ulcerate. Gli esemplari pervenuti in laboratorio sono stati sottoposti ad esame parassitologico, batteriologico ed istologico. All'apertura della cavità corporea non si osservavano alterazioni evidenti a carico degli organi interni. L'esame parassitologico ha permesso di osservare la presenza di rare metacercarie di trematodi Digenei a livello branchiale. L'esame microscopico di preparati su vetrino allestiti per impronta da milza e fegato e colorati con Ziehl-Neelsen classico e Ziehl-Neelsen modificato per *Nocardia* spp., ha evidenziato la presenza di batteri acido resistenti solo con la seconda metodica. L'esame colturale per batteri è stato condotto da lesioni cutanee, rene, milza e cervello su Tryptic Soy Agar (TSA), TSA+2%NaCl, Brain Heart Infusion Agar (BHIA), Blood Agar (BA), Thiosulphate Citrate Bile Salts (TCBS), Glucose Yeast Extract +Penicillina+Acido Oxolinico Agar (GY+P+OX Agar), *Flexibacter maritimum* Medium (FMM), Middlebrook 7H10 e Löwenstein-Jensen, incubati a 25° C ± 1 e 30° C ± 1 fino a 2 mesi. In 24 ore si è osservata la crescita di colonie cremose, biancastre e sciamanti su TSA+2%NaCl, pigmentate in giallo su TCBS, identificate come *Vibrio alginolyticus* sulla base di test biochimici condotti sia in sistemi miniaturizzati in galleria che in macrometodo. Parallelamente si è evidenziata la crescita in 72h su TSA+2%NaCl, BA, BHI, Middlebrook 7H10, di colonie bianco-giallastre a margini irregolari, rugose con morfologia “ad uovo fritto”. Le prove biochimiche hanno permesso di definire quest'ultimo ceppo batterico come ossidasi negativo, catalasi positivo, immobile, nitrati negativo, arisulfatasi negativo, ureasi positivo, non idrolizzante xantina, ipoxantina e tiroxina e resistente al lisozima. Sono state condotte prove di crescita a diverse temperature e su terreni selettivi, utilizzando inoltre sistemi di identificazione in micrometodo API ZYM, API 20C AUX e API 50CH come descritto da Kattar *et al.* (2001). In base alle caratteristiche fenotipiche il germe è stato identificato come *Tsukamurella paurometabola*. L'esame istologico condotto con Ematossilina-Eosina, Giemsa, PAS e Ziehl-Neelsen ha permesso di osservare la presenza di edema branchiale con infiltrazione di cellule a granuli eosinofili, grave degenerazione idropica e vacuolare del rene, necrosi dell'epitelio dei tubuli con presenza di batteri acido resistenti all'interno dei macrofagi del tessuto interstiziale. La muscolatura scheletrica si presentava gravemente necrotica con diffusa presenza di batteri. Interessante appare l'isolamento di *T. paurometabola*, actinomicete “nocardioforme” strettamente correlato al genere *Mycobacterium*, e di *V. alginolyticus* nel corso di un grave episodio morboso osservato in cavallucci marini stabulati in un acquario pubblico nazionale. Entrambi i microrganismi, considerati ubiquitari in ambiente acquatico, potrebbero essere in grado di causare patologia in seguito a forti condizionamenti ambientali e fattori stressanti.

## MALATTIE DELLA TROTA MARMORATA (*SALMO TRUTTA MARMORATUS*, CUVIER 1817) IN ALLEVAMENTO

Giavenni R.<sup>1</sup>, Berton D.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> S.A.I.S. (Società Agricola Ittica Selvuzza) srl, Via Rot, 10 – 33080 Zoppola (PN);

<sup>2</sup> Università degli Studi di Udine, Facoltà di Medicina Veterinaria, Dipartimento di Scienze della Produzione Animale, Unità di Patologia Generale e Ittiopatologia, Via delle Scienze, 206 – 33100 Udine

La Trota Marmorata (*Salmo trutta marmoratus*, Cuvier, 1817) viene classificata, in ambito ittologico, come emispecie della superspecie *Salmo trutta*. Essa costituisce un esempio di endemismo degli affluenti di sinistra del bacino idrografico padano, dei fiumi dell'area veneto-friulana, dei fontanili lombardi, delle risorgive venete e friulane e forse di alcuni corsi d'acqua dell'ex Jugoslavia e dell'Albania. Già in progressiva rarefazione a causa di interventi idraulico-ingegneristici attuati su taluni bacini idrici (sbarramenti, dighe, regimazioni, cementificazioni, rettificazioni, ecc.) e di alterazioni qualitative e quantitative prodotte da attività agro-zootecniche, industriali ed urbane, la Marmorata ha subito anche il rischio di estinzione a causa del danno biologico derivato da massicci ripopolamenti con trote fario. Queste ultime, infatti, immesse in modo dissennato un po' ovunque a scopo alieutico, hanno interferito pesantemente nei processi riproduttivi della Trota Marmorata, ibridandosi con essa e dando origine, in misura oltremodo "innaturale", a ibridi fecondi. La situazione di rischio, in cui si è venuta a trovare la Trota Marmorata, ha costretto l'adozione di pratiche di recupero in ambiente circoscritto. Sono pertanto sorte diverse iniziative di allevamento, grandi e piccole, sempre però a partire da soggetti selvatici catturati in ambiente naturale; da questo momento si cominciano a dover affrontare, anche in termini terapeutici, le malattie di questo nuovo salmonide di allevamento. In aggiunta, la normativa italiana relativa alla semina in acque libere ha sicuramente determinato, da parte degli operatori del settore, una maggiore attenzione agli episodi morbosi che possono insorgere negli allevamenti. Con questo lavoro, risultante da più anni di osservazioni sul campo, si vuole contribuire alla conoscenza della Trota Marmorata anche sotto il profilo della sensibilità alle diverse malattie. In totale sono stati effettuati 161 campionamenti nell'arco di 11 anni (1993 – 2003), per un totale di 1374 esemplari esaminati. Gli esami sono consistiti in indagini microscopiche a fresco per la ricerca di agenti parassitari ed in indagini batteriologiche (colorazione di impronte d'organo e/o colture batteriche). Le indagini microscopiche a fresco di cute, branchie e contenuto gastro-enterico, hanno consentito di rilevare episodi di examitiasi, di girodattilosi cutanea, di infestioni cutanee sostenute da ciliati sessili, episodi di saprolegniosi cutanea, di saprolegniosi branchiale, di ictioftiriasi cutanea, di ictioftiriasi branchiale, di ictiobodosi cutanea, di ictiobodosi branchiale e di tricodiniasi cutanea. Particolarmente significativo sembra essere il riscontro, anche se in unico episodio, di malattia proliferativa renale in trotelline 1+. Con le ricerche di carattere batteriologico sono stati diagnosticati 279 casi di malattia. La foruncolosi è stata diagnosticata in 115 casi, la flavobatteriosi cutanea in 90 casi e la nefrite batterica in 74 casi. Nell'ambito di questa indagine, non sono state riscontrate, ad oggi, altre patologie batteriche, né patologie di natura virale. Come era ovvio attendersi, la patologia della Trota Marmorata non sembra discostarsi, per il momento, dalla patologia dei salmonidi, in genere, e della trota fario, in particolare. Con l'attuale proliferare delle realtà produttive a fini alieutici è però facile attendersi, per il prossimo futuro, qualche interessante eccezione.

## PRESENZA DI *PISCINOODINIUM PILLULARE* IN *FUNDULOSOMA* E *NOTHOBRANCHIUS* D'ACQUARIO

Prearo M., Colussi S., Marchis D., Ferrari A., Amato G.

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Via Bologna 148, 10154 Torino*

I killi sono pesci ancora poco comuni tra gli acquariofili, caratterizzati da una morfologia estremamente varia e da innumerevoli variazioni cromatiche. Essi appartengono alla famiglia *Cyprinodontidae*; sono stati rinvenuti in tutti i continenti ad eccezione dell'Oceania. In Italia l'unico rappresentante di tale famiglia è l'*Aphanius fasciatus* che popola le zone costiere salmastre. Ai killi appartengono oltre 600 specie, costituite da soggetti di piccola taglia, ovipari, distinti in annuali e non annuali, in relazione al ciclo vitale che li caratterizza.

Durante il mese di Ottobre 2003 sono pervenuti al laboratorio 8 killi appartenenti ai generi *Fundulosoma* e *Nothobranchius*, tutti esemplari di cattura. Il genere *Fundulosoma* è caratterizzato dall'essere monotipico cioè costituito da una sola specie: *F. thyerri*, tipicamente stagionale, diffuso prevalentemente in Africa e particolarmente delicato se mantenuto in cattività. Al genere *Nothobranchius* appartengono invece le specie stagionali più diffuse del continente africano.

Lo stato di cattività dei pesci d'acquario favorisce l'instaurarsi di svariate patologie tra cui quelle parassitarie. Vi sono in particolar modo alcuni fattori predisponenti lo sviluppo delle parassitosi: fattori abiotici quali temperatura, ossigeno, pH, condizionano sia la capacità replicativa, invasiva e di sopravvivenza del parassita, sia il benessere dei pesci. Vi sono poi fattori biotici caratteristici invece dell'ospite e del parassita stesso, quali stato immunitario del pesce e virulenza del patogeno. I protozoi, a cui appartiene il genere *Piscinoodinium*, oggetto del nostro studio, trovano in acquario le condizioni ottimali per il proprio sviluppo. *P. pillulare* è l'agente eziologico della Oodiniiasi d'acqua dolce, nota anche come "malattia del velluto", una delle più importanti e dannose patologie parassitarie dei pesci d'acquario dulciacquicoli.

Degli 8 soggetti analizzati, 4 sono risultati positivi all'esame parassitologico per *P. pillulare*; essi presentavano un'infestazione massiva, con tipico aspetto vellutato della cute ed emorragie corporee diffuse associate a ipermucosità, riscontrata anche a livello branchiale. La diagnosi è stata effettuata sia macroscopicamente sia microscopicamente; l'esame microscopico dei trofonti risulta infatti necessario per la conferma diagnostica.

La terapia comunemente utilizzata nel caso di infestazioni da *Oodinium* si basa sull'utilizzo di solfato di rame, ad una dose indicativa di 0,163 g/100 litri d'acqua. Nel caso dei killi non è stato però possibile applicarla a causa dell'elevata tossicità del prodotto esercitata su questo gruppo di pesci. La terapia effettuata si è basata pertanto sull'utilizzo di solfato di chinino, una capsula di 300 mg ogni 20 litri per il trattamento degli adulti e 150 mg per 20 litri per gli avannotti; l'acqua è stata completamente sostituita dopo 3 giorni; Al termine della terapia i pesci trattati apparivano vitali e non si sono verificati casi di reinfestazione o di intossicazione acuta.

## REPERTI PARASSITOLOGICI IN *SYMPHYSODON AEQUIFASCIATUS* (PELLEGRIN 1904) D'IMPORTAZIONE

Blasilli M.<sup>1</sup>, Di Cave D.<sup>1</sup>, Di Cicco E.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Sanità Pubblica e Biologia Cellulare Università di Roma "Tor Vergata", Via Montpellier, 1- 00133, Roma; <sup>2</sup> Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Camerino

E' noto che il rischio di introduzione di parassiti e parassitosi "esotiche" attraverso l'importazione di pesci ornamentali di diversa provenienza è reale e non deve essere sottovalutato sia per il danno economico che interessa il mercato sia per la possibile trasmissione a specie ittiche autoctone di nuovi patogeni.

Come ulteriore contributo alla conoscenza dei parassiti di pesci ornamentali il presente lavoro riporta i dati preliminari su *Symphysodon aequifasciatus* una specie di notevole valenza commerciale comunemente conosciuta con il nome di discus.

Sono stati esaminati 15 esemplari (di peso medio di g. 50) provenienti da Bangkok e stabulati in un impianto del Lazio.

Su tutti i soggetti sono stati eseguiti: esame necroscopico completo, esame microscopico a fresco di cute, branchie e organi interni per l'identificazione dei protozoi, montaggio *in toto* in gelatina glicerinata per l'identificazione dei monogenei e chiarificazione in lattofenolo di Amman per i nematodi. Inoltre sono stati allestiti preparati di sezioni dell'intestino per l'esame istopatologico.

In tabella sono riportati i reperti ottenuti secondo la loro localizzazione.

Parassita	Branchie	Intestino
<b>Protozoa</b>	<i>Trichodina</i> sp.	<i>Balantidium</i> sp. <i>Protoopalina symphysodonis</i>
<b>Monogenea</b>	Dactylogyridae	
<b>Nematoda</b>		<i>Ichthyouris</i> sp. <i>Capillaria pterophyllii</i>

## PKD: DUE ANNI DI RICERCHE IN ITALIA

Caffara M., Gustinelli A., Prearo M.\*, Brunetti R. \*, Borghesan F.\*\* , Manfrin A.\*\* , Taticchi M.I.°, Fioravanti M.L.

*Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale, Università di Bologna. \* Istituto Zooprofilattico del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino, \*\*Istituto Zooprofilattico delle Venezie, Legnaro (PD), °Dipartimento di Biologia Animale ed Ecologia, Università di Perugia.*

A partire da aprile 2002 nell'ambito del Progetto di Ricerca corrente "Indagine epidemiologica sulla Malattia Proliferativa Renale (PKD) e valutazione dei metodi di rilevamento eziologico nei pesci e negli ospiti alternati" finanziato dal Ministero della Salute, sono state condotte indagini sulla diffusione di *Tetracapsuloides bryosalmonae* in 46 trotticoltura dell'Italia settentrionale ubicate in 5 diverse regioni (Piemonte, Lombardia, Veneto, Trentino Alto Adige e Friuli Venezia Giulia). Sono state prelevate in totale 2065 trote iridee (*Oncorhynchus mykiss*). Pool ottenuti per omogeneizzazione di porzioni di rene posteriore prelevate da 10-15 soggetti/allevamento venivano processati per l'estrazione del DNA mediante l'impiego di kit in colonnina (DNeasy Tissue Kit, Qiagen). Gli estratti sono stati quindi sottoposti a PCR con l'utilizzo di primers specifici per l'amplificazione di un frammento di 436 bp della SSU rDNA di *T. bryosalmonae*.

Ventisei (56,5%) dei 46 allevamenti considerati sono risultati positivi per *T. bryosalmonae*. Solo gli allevamenti siti nel Trentino Alto Adige sono risultati sempre negativi per *T. bryosalmonae*.

Sono stati parallelamente effettuati campionamenti di briozoi, considerati gli ospiti naturali di *T. bryosalmonae* (Myxozoa, Saccosporidae), in tutti i corsi d'acqua di alimentazione degli allevamenti considerati. Complessivamente sono stati presi in esame 32 fiumi/torrenti, compresi in 14 bacini idrografici del versante settentrionale del fiume Po.

I briozoi raccolti sono stati sottoposti ad esame microscopico a fresco per evidenziare l'eventuale presenza di stadi di sviluppo del parassita e quindi fissati in alcool 70° per la conduzione dell'identificazione di specie e della PCR. Sono state identificate 12 differenti specie di briozoi appartenenti ai generi *Plumatella*, *Fredericella*, *Paludicella* e *Cristatella*. Tutti i briozoi esaminati sono risultati negativi per *T. bryosalmonae* sia all'esame microscopico che alla PCR.

I risultati ottenuti hanno confermato la diffusione dell'agente eziologico della Malattia Proliferativa Renale nella maggior parte delle trotticoltura presenti nel versante settentrionale del fiume Po, fatta eccezione per il Trentino Alto Adige.

Il mancato riscontro di briozoi positivi per *T. bryosalmonae* sembra rafforzare l'ipotesi, già avanzata da autori stranieri, che esistano altri ospiti di maggiore importanza nell'epidemiologia della Malattia Proliferativa Renale.



## CARATTERIZZAZIONE ISTOLOGICA DELL'ENTEROMIXIDIOSI NELL'ORATA (*SPARUS AURATA*)

Agnetti F., Latini M., Manuali E., Panzieri C., Lauro L., Ghittino C.

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche Centro di Acquacoltura e Ittiopatologia - Via Salvemini 1 - 06126 Perugia*

L'Enteromixidiosi è un'infezione enterica sostenuta da *Enteromyxum leei*, mixozoo che colpisce l'apparato digerente degli sparidi, fra cui l'orata (*Sparus aurata*). E' una tipica malattia cronica "d'acqua calda", comparando in ambienti con temperatura sopra i 18° C. Il recente cambiamento climatico sta contribuendo alla sua sempre maggior gravità anche in Italia.

Nel corso dell'ultimo triennio sono stati monitorati diversi impianti di maricoltura nazionali, con lo scopo di valutare la diffusione della patologia e l'entità delle lesioni intestinali provocate dal parassita. In ciascun allevamento sono state considerate due popolazioni di pesci: una con condizioni cliniche riconducibili ad Enteromixidiosi (scarso appetito, dimagrimento, aspetto generale scadente) ed un'altra apparentemente sana, di controllo. Da ciascuna delle vasche considerate è stato effettuato un doppio campionamento annuale, in primavera ed in autunno. Le orate, una volta catturate e sacrificate con overdose di anestetico, sono state sottoposte ad esame anatomo-patologico, parassitologico a fresco ed istologico.

Gli esemplari provenienti da vasche con sospetta malattia si sono presentati magri, emaciati, con addome rigonfio e masse muscolari ridotte.

All'esame necroscopico è stata notata leggera anemia branchiale, ascite, lieve epatomegalia con aree degenerative, dilatazione ed arrossamento del pacchetto intestinale; all'apertura del tubo digerente è stata evidenziata un'imponente enterite catarrale-emorragica, soprattutto a carico dell'ultimo tratto intestinale. L'entità di queste lesioni è progressivamente peggiorata nel periodo intercorrente tra i due campionamenti: le orate prelevate in autunno, infatti, hanno mostrato un quadro anatomo-patologico più severo rispetto a quelle catturate in primavera.

All'esame microscopico a fresco dei raschiati di mucosa enterica è stata notata presenza di poche spore e sporoblasti di *E. leei* nei pesci analizzati in primavera, che sono poi aumentate in autunno.

L'esame istologico ha posto in evidenza una prevalenza di stadi parassitari precoci (trofozoi), con scarsa risposta infiammatoria, nei pesci prelevati durante il periodo primaverile; in quelli prelevati durante il periodo autunnale, invece, si è notata una maggiore presenza di stadi parassitari maturi (sporoblasti e spore), con una più marcata risposta infiammatoria intestinale.

I dati ottenuti hanno permesso di stabilire come l'Enteromixidiosi sia ampiamente diffusa in tutta Italia. L'impatto di questa malattia debilitante, la principale per l'orata, si confronta con l'assenza di presidi terapeutici efficaci e con la necessità di prevenirne l'ulteriore diffusione con misure profilattiche dirette, evitando l'introduzione di novellame infetto in allevamento. L'esame istologico è risultato un metodo diagnostico affidabile, che consente sia di evidenziare gli stadi immaturi del mixozoo durante le fasi iniziali della malattia, sia di valutare il grado d'infezione, da utilizzare in parallelo con metodiche biomolecolari (PCR).

## NUOVE OSSERVAZIONI SULLE MIXOSPORIDIOSI MARINE

Fioravanti M.L., Caffara M., Florio D., Gustinelli A., Marcer F.

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

Le mixosporidiosi sono malattie parassitarie sostenute da diverse specie di organismi appartenenti alla classe Myxosporea (phylum Myxozoa), che comprende microscopici metazoi a vocazione parassitaria. Nell'ultimo decennio numerose mixosporidiosi sono state descritte in specie ittiche marine allevate nel bacino del Mediterraneo, tanto che vengono attualmente comprese fra le patologie emergenti in maricoltura, dove possono causare serie perdite produttive fino a limitare, in taluni casi, l'allevamento di specie ittiche particolarmente sensibili. A tal riguardo va senz'altro citata la Enteromixosi, sostenuta da *Enteromyxum leei*, che ha portato al progressivo abbandono dell'allevamento del sarago pizzuto in alcune regioni mediterranee e che determina gravi perdite nell'orata. La scarsa ospite-specificità di *E. leei*, dimostrata in corso di infezioni sperimentali, è stata ampiamente confermata da segnalazioni di episodi naturali di Enteromixosi in numerose specie ittiche, fra cui si è aggiunta recentemente anche la spigola. In relazione a quest'ultima specie, le osservazioni si riferivano ad animali allevati in Francia in stretta promiscuità con orate parassitate ed in cui non si evidenziavano segni clinici di malattia. Riportiamo qui un episodio analogo osservato in spigole allevate intensivamente in Italia, questa volta con evidenziazione di sintomatologia clinica riferibile all'infezione da *E. leei*, a conferma dell'ipotesi che le condizioni forzate d'allevamento possono portare ad un adattamento del parassita a nuovi ospiti, soprattutto a causa della facile trasmissione per via diretta che caratterizza questa specie. Oltre alla Enteromixosi, altre mixosporidiosi sono state descritte negli ultimi anni in Italia, come ad esempio le Sferosporosi della spigola da *Sphaerospora dicentrarchi* e *S. testicularis*, e le infezioni da *Polysporoplasma sparis* e da *Henneguya* sp. nell'orata, a dimostrazione della estrema diffusione dei parassiti Myxosporea negli ambienti marini mediterranei e dei rischi sanitari correlati alla crescente movimentazione di materiale biologico a fini produttivi. A tal riguardo viene qui riportato un caso di infezione renale da *Leptotheca sparidarum* verificatasi in orate allevate intensivamente nel nostro Paese. Non ancora segnalato in Italia, questo mixosporidio assume rilievo in quanto non se ne conosce con esattezza il ruolo patogeno e risulta descritto anche nel dentice, ad indice di una scarsa ospite-specificità.

Il rilevamento di nuovi ospiti e di specie di mixosporidi non ancora descritte sul territorio nazionale conferma la crescente importanza di questi patogeni negli ambienti di maricoltura ed indica la necessità di ampliare le conoscenze sulla loro epidemiologia, biologia e patogenicità. In particolare, la carenza di informazioni scientifiche relative al ciclo biologico dei mixosporidi marini rende estremamente difficile individuare i fattori di rischio che possono introdurre o amplificare l'infezione, vanificando qualsiasi azione di prevenzione e controllo in allevamento.

## REPERTI PARASSITOLOGICI IN PESCI LUNA (*MOLA MOLA*) DEI MARI ITALIANI

Gustinelli A., Nardini G., Aureli G., Trentini M.\*, Beraldo P.\*\*, Prearo M.°, Fioravanti M.L.

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

*\* Dipartimento di Biologia Evoluzionistica e Sperimentale, Università di Bologna;*

*\*\* Dipartimento di Produzioni Animali, Università di Udine, ° Istituto Zooprofilattico del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino*

Alla luce della carenza di dati scientifici sulla parassitofauna dei Pesci Luna (*Mola mola*) dei nostri mari, ed in relazione al fenomeno dello spiaggiamento osservato periodicamente lungo le coste nazionali, in collaborazione con i componenti del gruppo Progetto *Mola mola* ONLUS si è svolta un'indagine parassitologica su 2 *M. mola* pescati accidentalmente nel Golfo di Napoli e 5 soggetti spiaggiati lungo le coste tirreniche ed adriatiche. Su ogni soggetto esaminato, dopo aver compilato la scheda di segnalamento, sono stati condotti esami necroscopici e parassitologico. È stato possibile condurre l'esame istologico solo su un soggetto spiaggiato a Trieste, in quanto tutti gli altri erano stati sottoposti a prolungato congelamento. I parassiti rinvenuti sono stati fissati in alcool 70° o in AFA, quindi chiarificati in Lattofenolo di Amman e sottoposti ad identificazione mediante microscopia ottica. Alcuni esemplari sono stati disidratati, inclusi in esametildisalazano e sottoposti a metallizzazione in oro per la successiva osservazione mediante SEM. In tutti i soggetti esaminati è stato possibile rilevare la presenza di almeno una specie parassitaria. In particolare sono stati osservati i seguenti reperti:

Localizzazione	reperto parassitario
Branchie	<i>Cecrops latreillii</i> (Copepoda, Cecropidae)
Cavità orale	<i>Ceratothoa steindachneri</i> (Isopoda, Cymothoidae)
Cute e cavità orale	<i>Lepeophtheirus</i> sp. (Copepoda, Caligidae)
Cavità orale ed esofago	<i>Accacoelium contortum</i> (Digenea, Accacoeliidae)
Stomaco	<i>Ancistrocephalus microcephalus</i> (Cestoda, Pseudophyllidea)
Stomaco e intestino	<i>Accacladocoelium macrocotyle</i> (Digenea, Accacoeliidae)
Intestino	Triaenophoridae (Cestoda, Pseudophyllidea)
Intestino	Cestoda Pseudophyllidea
Fegato	<i>Pterobothrium</i> sp. (Cestoda, Trypanorhyncha)
Muscolo e fegato	<i>Molicola horridus</i> (Cestoda, Trypanorhyncha)

Benché non sia stato possibile effettuare rilievi istopatologici che potessero indicare gli effetti patogeni dei parassiti riscontrati, l'elevato numero di specie parassitarie riscontrate e la considerevole intensità d'infestazione ad esse associata, lasciano supporre un importante ruolo dei parassiti nel condizionare lo stato di benessere di *M. mola* e quindi, presumibilmente, favorire alcuni episodi di spiaggiamento.

## RILIEVI ANATOMOISTOPATOLOGICI SU UN ESEMPLARE DI PESCE LUNA (*MOLA MOLA*) SPIAGGIATO NEL GOLFO DI TRIESTE

Beraldo P.<sup>1</sup>, Colla A.<sup>2</sup>, Gustinelli A.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> *Università degli Studi di Udine, Facoltà di Medicina Veterinaria, Dipartimento di Scienze della Produzione Animale, Via delle Scienze, 206 – 33100 Udine;* <sup>2</sup> *Museo Civico di Storia Naturale di Trieste;* <sup>3</sup> *Dip. Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale, Università di Bologna, Via Tolara di Sopra, 50 – 40064 Ozzano Emilia (BO)*

Nell'aprile del 2001, nel golfo di Trieste è stato avvistato un esemplare di pesce luna, in seguito ritrovato spiaggiato sull'arenile di Grignano. L'animale è stato recuperato e trasportato nella struttura del vecchio mercato ittico di Trieste, dove è stato conservato in ghiaccio fino al momento dei rilievi biologici, anatomopatologici e parassitologici, condotti dal personale del Museo di Storia Naturale e dell'Università di Trieste. In questa occasione, durante l'esame necroscopico, è stato possibile prelevare dall'animale porzioni di alcuni organi viscerali da sottoporre all'esame istologico e parte dei parassiti presenti nel lume intestinale. Porzioni di fegato, intestino, gonadi e milza sono stati fissati in formalina neutra tamponata al 4%, processati secondo procedure istologiche standard e le sezioni ottenute sono state colorate con ematossilina-eosina, tricromica di Masson e PAS. Lo stato di conservazione degli organi è apparso soddisfacente dal punto di vista istologico, sebbene fossero state notate alterazioni dovute alla lisi post-mortale soprattutto nel fegato.

Il pesce luna spiaggiato, probabilmente morto di inedia a causa di un grosso amo conficcato nel palato, era alto 2,3 m (dalla pinna dorsale a quella anale) e largo 2m, il quale, in condizioni normali, avrebbe avuto un peso di circa 7 quintali contro i 4 registrati. Questo esemplare era una femmina, come è apparso evidente dall'aspetto delle gonadi in fase necroscopica e confermato dall'esame istologico che ha evidenziato ovociti a diversi stadi di maturazione; si notavano inoltre formazioni granulomatose circondate da una discreta reattività fibroconnettivale e cellulare associata alla presenza di numerosi aggregati melanomacrofagici. Macroscopicamente gli altri organi viscerali apparivano sostanzialmente nella norma, anche se la cistifellea era particolarmente ectasica e il fegato presentava una colorazione molto scura e sulla glissoniana si notavano formazioni vescicolari riferibili ad elementi parassitari. Istologicamente a livello epatico si riscontravano sezioni di parassiti metazoi circondate da una modesta reazione fibroconnettivale (in alcuni casi assente) associata a un blando infiltrato cellulare, riconducibili probabilmente a stadi larvali di cestodi. All'apertura dell'apparato enterico il lume appariva occupato da un cospicuo numero di parassiti (prevalentemente cestodi ed alcuni esemplari di trematodi digenei della famiglia Accacoeliidae) e la mucosa si presentava iperplastica con emorragie diffuse. L'esame istologico di porzioni intestinali ha rilevato uno stato infiammatorio della mucosa caratterizzato da erosione e necrosi epiteliale, infiltrato leucocitario; oltre a ciò si osservavano molteplici granulomi localizzati nelle diverse porzioni della parete intestinale. Il quadro intestinale era riferibile a un'enterite catarrale, probabilmente di origine parassitaria. A livello splenico, l'esame microscopico metteva in risalto numerosi centri melanomacrofagi, anche di notevoli dimensioni, caratterizzati da una colorazione ocrea; la struttura degli ellissoidi appariva ben evidente e la polpa bianca e rossa erano distintamente riconoscibili, diversamente da quanto si osserva comunemente in specie ittiche marine quali il branzino e l'orata. Quest'ultimo carattere potrebbe quindi essere peculiare di *Mola mola*.

Questo esemplare di pesce luna è stato destinato al Museo Civico di Storia Naturale di Trieste, dove verrà esposto assieme ad altri esemplari imbalsamati.

## SEGNALAZIONE DI MICOSI VISCERALE IN OMBRINE BOCCADORO (*ARGYRO SOMUS REGIUS*) ALLEVATE INTENSIVAMENTE

Manuali E., Agnetti F., Latini M., Checcarelli S., Ghittino C.

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Centro di Acquacoltura e Ittiopatologia - Via Salvemini 1 - 06126 Perugia*

La presenza nei pesci di lesioni granulomatose a carattere sistemico può essere determinata da fattori eziologici diversi, fra cui agenti infettivi, tossine, errori nutrizionali e disordini metabolici. I funghi, nello specifico, sono spesso causa di complicanze secondarie. Viene qui descritto un caso di micosi viscerale riscontrato in ombrine boccadoro (*Argyrosomus regius*) poste sotto monitoraggio in quanto precedentemente colpite da Granulomatosi Sistemica. Il focolaio è stato osservato in soggetti di due anni e del peso di 1,5 – 2 kg. Gli esemplari interessati mostravano esoftalmo bilaterale e cheratite, associati a lesioni cutanee a carattere ulcerativo disseminate principalmente sulla testa, sulle regioni latero-ventrali ed in corrispondenza dell'inserzione delle pinne.

L'esame necroscopico ha evidenziato l'esistenza di lesioni granulomatose in sede renale, splenica, epatica e cardiaca, con particolare coinvolgimento delle sierose viscerali, che sono risultate sede di processi fibrinosi. L'esame parassitologico, eseguito mediante osservazione microscopica a fresco di raschiati dalle ulcere cutanee, non ha evidenziato presenza di ectoparassiti. L'esame batteriologico, condotto sia sui comuni terreni colturali che su terreni selettivi per germi acido-resistenti, è risultato negativo, non essendosi verificato sviluppo di colonie dopo 72 ore - 21 giorni di incubazione a 22° C. L'esame micologico, allestito da materiale cutaneo e viscerale, ha evidenziato crescita in purezza di colonie fungine verdastre, polverulente in superficie e bianche sul fondo, ascrivibili al genere *Penicillium*.

L'indagine istologica delle lesioni ulcerative cutanee ha rilevato perdita totale dello strato epidermico in associazione ad una marcata reazione infiammatoria cronica, infiltrante anche i piani muscolari, in risposta alla presenza di ife settate e PAS positive. In tutti gli altri organi esaminati è stata riscontrata presenza di lesioni granulomatose non capsulate, provviste di un centro necrotico e con margini irregolari per l'interposizione di numerosi elementi fungini. In tali sedi, le sierose parietali sono risultate coinvolte nel processo patologico e fortemente ispessite a seguito dell'intensa proliferazione da parte di fibroblasti.

I dati ottenuti, hanno permesso di correlare le lesioni osservate con il fungo isolato, la cui identificazione di specie è tuttora in corso. La presenza di *Penicillium spp.* nei soggetti esaminati, riscontrata ad un anno di distanza dalla comparsa della Granulomatosi Sistemica, va interpretata come di natura secondaria. E' ipotizzabile, infatti, che lo stato debilitante indotto dalla patologia nutrizionale primaria abbia consentito al micete, normalmente appartenente alla flora saprofitica acquatica, di penetrare per via transcutanea e diffondere all'interno dell'organismo, contribuendo a compromettere le funzioni vitali dei pesci e la loro qualità commerciale.

## RISULTATI PRELIMINARI SULLO STATO SANITARIO DI POPOLAZIONE SELVATICHE DI GAMBERO D'ACQUA DOLCE *AUSTROPOTAMOBIVS PALLIPES* NEL NORD ITALIA

Quaglio F.<sup>1</sup>, Morelli C.<sup>1</sup>, Galuppi R.<sup>2</sup>, Marcer F.<sup>2</sup>, Nobile L.<sup>3</sup>, De Luise G.<sup>4</sup> & Bonoli C.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Scienze degli Alimenti Università di Bologna; <sup>2</sup> Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale, Università di Bologna, Via Tolara di Sopra, 50 – Ozzano Emilia (BO); <sup>3</sup> U.V.A.C. Emilia-Romagna/B.I.P. Bologna; <sup>4</sup> Libero Professionista, Reana del Rojale (UD)

Nell'ambito di un progetto finanziato dal Ministero delle Politiche Agricole e Forestali, finalizzato alla conservazione della specie autoctona di gambero d'acqua dolce *Austropotamobius pallipes*, sono state condotte indagini sanitarie su popolazioni selvatiche del nord Italia, allo scopo di valutare la presenza di eventuali patologie di natura parassitaria, micologica e batteriologica. Un totale di 102 gamberi d'acqua dolce sono stati catturati durante l'autunno 2003 da 5 diversi corsi d'acqua del dell'Emilia Romagna e del Friuli Venezia Giulia. Una parte degli animali (58 soggetti) è stata utilizzata per verificare la possibilità di riprodurre ed allevare la specie in ambiente controllato per la produzione di materiale da utilizzare in azioni di ripopolamento, mentre, su 44 gamberi sono state eseguite indagini parassitologiche, micologiche e batteriologiche. Gli esami parassitologici sono stati effettuati a fresco su porzioni di branchie, intestino e muscolo addominale; le indagini micologiche attraverso la semina in terreni di coltura specifici di porzioni di esoscheletro di zampe e cuticola addominale che presentavano lesioni; gli esami batteriologici da prelievi di emolinfa seminati su terreni di coltura. Su tutti i soggetti sottoposti ad indagini sanitarie sono state eseguite osservazioni anatomopatologiche ed istologiche da sezioni di cefalotorace ed addome colorate mediante Ematossilina Eosina, Giemsa e PAS.

Nelle osservazioni a fresco si rilevava la sola presenza di protozoi peritrichi ectocommensali appartenenti ai generi *Epystilis* e *Cothurnia*, presenti nella camera branchiale e sui filamenti delle branchie e la presenza di branchiobdellidi. *Fusarium* sp. e *Saprolegnia parasitica* sono stati isolati da alcune lesioni della cuticola, mentre ifomiceti ialini e dematiacei venivano riscontrati frequentemente. Nell'emolinfa di soggetti vivi e moribondi: le specie batteriche più frequentemente isolate risultavano *Citrobacter freundii* e *Aeromonas hydrophila*. Vengono riportati i risultati delle osservazioni anatomo-istopatologiche.

## LE INFEZIONI DA COCCHI GRAM POSITIVI IN EUROPA: STATO DELL'ARTE ED ASPETTI DI SANITA' PUBBLICA

### GRAM POSITIVE COCCAL INFECTIONS IN EUROPE: STATE OF THE ART AND PUBLIC HEALTH ASPECTS

Ghittino C., Latini M., Agnetti F., Petracca G.

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Centro di Acquacoltura e Ittiopatologia - Via Salvemini 1 - 06126 Perugia*

Le infezioni da cocchi Gram positivi, note anche con il termine generico di "Streptococcosi", sono malattie a diffusione cosmopolita che colpiscono sia pesci dulciacquicoli che marini. Possono essere sostenute da diversi agenti eziologici, fra i quali alcuni patogeni in acque calde (con temperatura oltre i 15° C), come *Lactococcus garvieae*, *Streptococcus agalactiae*, *S. iniae* e *S. parauberis*, ed altri patogeni in acque fredde (con temperatura inferiore ai 12° C), come *Vagococcus salmoninarum*. Sono accomunate e caratterizzate dal fatto di colpire elettivamente pesci di grossa taglia (peso superiore ai 50 g) e di provocare comparsa di un evidente esoftalmo; il novellame risulta invece pressoché refrattario.

Le "Streptococcosi" d'acqua calda sono di gran lunga le più importanti; vengono spesso annoverate tra le patologie dominanti e sono responsabili di notevoli danni economici in varie forme di piscicoltura.

L'infezione da *L. garvieae* o Lattococcosi è apparsa in Europa a partire da fine degli anni ottanta – primi anni novanta e si è diffusa a macchia d'olio nelle trotecolture di numerosi Paesi (fra i più importanti Spagna, Francia, Italia, Regno Unito, Germania, Danimarca, Grecia, Turchia, Israele). In Italia è considerata la principale responsabile del calo del 40% della produzione annua di trote, passata dalle 50.000 t del 1995 alle attuali 30.000 t. La sua prevalenza risulta molto alta negli allevamenti di pianura, riforniti da acque di superficie. La Lattococcosi nella trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*) evolve in forma setticemica acuta, con pesanti mortalità (30-50%) durante il periodo estivo (tra maggio ed ottobre). I segni clinici sono rappresentati da letargia, anoressia, melanosi e tipico esoftalmo bilaterale, con evidente protrusione dei globi oculari; alla necropsopia si osserva una peculiare diatesi emorragica, con panoftalmite, cheratite, lieve anemia branchiale, meningite, pericardite, teleangectasia epatica, emorragie viscerali, splenomegalia, enterite emorragica.

L'infezione da *S. agalactiae* rappresenta, sin dagli anni ottanta, il principale problema sanitario negli allevamenti israeliani di tilapie (ibridi di *Oreochromis* sp.). Il germe è particolarmente virulento a temperature delle acque superiori ai 18-20° C ed ha uno spiccato tropismo cerebrale.

L'infezione da *S. iniae* è diffusa in alcuni Paesi del bacino del Mediterraneo orientale, fra cui Israele, dove colpisce sia specie dulciacquicole, quali trota iridea, tilapie, persicospigola (ibridi di *Morone saxatilis* x *M. chrysops*), sia specie marine, come ombrina ocellata (*Sciaenops ocellatus*) e branzino (*Dicentrarchus labrax*). La malattia non è stata finora segnalata in Europa occidentale. Nella trota iridea ha un andamento clinico ed è all'origine di perdite simili a quelle determinate dalla Lattococcosi, ma se ne differenzia per localizzarsi a livello del SNC, con assenza di lesioni ascrivibili a diatesi emorragica. Nel branzino la malattia provoca mortalità contenuta, evolve con decorso cronico e si manifesta esclusivamente con un accentuato esoftalmo mono o bilaterale associato ad opacamento corneale, congestione ed edema cerebrale. Nell'ombrina ocellata, invece,

causa mortalità molto elevate, evolve in forma setticemica subacuta ed ha come peculiarità quella di generare una dermatite ulcerativa con miosite necrotizzante.

L'infezione da *S. parauberis* è considerata una fra le più importanti patologie presenti negli allevamenti spagnoli di rombo (*Scophthalmus maximus*), distribuiti lungo la costa atlantica. Si manifesta in forma setticemica subacuta, con sviluppo di una patognomonica panoftalmite suppurativa. Recentemente, il germe è stato isolato in Francia anche nel branzino.

Le "Streptococcosi" d'acqua fredda sono esclusive dei salmonidi e, in alcuni Paesi (Spagna, Francia e Italia), sono considerate patologie emergenti. L'infezione da *V. salmoninarum* o Vagococcosi è presente soprattutto nelle trotiltiture di montagna e provoca mortalità a stilloidio persistenti. Trattasi di una malattia cronica, caratterizzata dal presentare periodi durante i quali il germe risulta localizzato esclusivamente in occhio e cervello, alternati a periodi in cui si manifestano accessi setticemici. I segni clinici sono rappresentati da accentuato esoftalmo bilaterale, spesso accompagnato da rottura dei globi oculari; alla necropsia si osservano panoftalmite, cheratite, spiccata anemia branchiale, meningite, pericardite, splenomegalia, lievi emorragie epatiche e peritoneali.

La diagnosi differenziale tra le infezioni da cocchi Gram positivi si basa sui reperti anatomopatologici, sull'isolamento degli agenti eziologici e sulla loro identificazione mediante caratterizzazione fenotipica (prove colturali e biochimiche) e/o genomica (utilizzo della PCR).

Il controllo delle "Streptococcosi" d'acqua calda è problematico, specie in trotiltura. La terapia con mangime medicato dà scarsi risultati, e ciò per una serie di fattori, fra cui l'estrema virulenza di *L. garvieae* e *S. iniae* per la trota iridea, la precoce comparsa di anoressia, le continue ricadute e l'instaurarsi di fenomeni di antibiotico-resistenza. L'uso ripetuto di antibiotici, oltre al costo notevole ed all'indesiderato impatto ambientale, comporta la sistematica presenza di residui nel pesce, che ne impediscono la commercializzazione durante l'intero periodo estivo.

Al contrario della terapia, la profilassi vaccinale si sta rivelando un valido metodo di controllo della Lattococcosi. Recenti sperimentazioni hanno dimostrato come la vaccinazione per immersione non sia efficace, mentre la somministrazione di vaccino per via endoperitoneale, alla dose di 0,2 ml/individuo, conferisce un buon grado di protezione nei confronti dell'infezione naturale. Tale somministrazione, condotta a fine aprile su trote di taglia superiore ai 50 g, è in grado di indurre una solida risposta immunitaria, della durata di 3 mesi impiegando bacterin e di 5-6 mesi utilizzando vaccini adiuvati oleosi. E' in fase di studio l'impiego, come richiamo, della vaccinazione orale.

Alcune specie di cocchi Gram positivi isolate nei pesci possono essere patogene (*S. iniae*), o considerate potenzialmente patogene (*L. garvieae*), anche per l'uomo. Mentre per le prime sono stati documentati casi di trasmissione della malattia in seguito a manipolazione di pesci infetti, per le seconde non è finora stato dimostrato un contagio da pesce a uomo.

*S. iniae* va a tutti gli effetti annoverato fra gli agenti zoonosici di origine ittica: negli episodi umani descritti, l'infezione è stata messa in relazione a ferite cutanee provocate da punture di spine di tilapie infette, nel corso di operazioni di eviscerazione e toelettatura dei pesci. Il fatto che, oltre alla consueta cellulite localizzata alle mani, siano stati rilevati casi di setticemia, mette in guardia sulla patogenicità del germe per l'uomo. Poiché l'infezione da *S. iniae* sembra trasmettersi solo attraverso ferite, la manipolazione di quelle specie dotate di spine, come ad esempio branzino ed orata, deve essere effettuata con particolare attenzione.

Secondo quanto riportato in letteratura, *L. garvieae* può causare infezioni setticemiche ed urinarie nell'uomo, in particolare nei soggetti immunocompromessi. Nessun caso



umano è però stato finora segnalato fra gli operatori degli allevamenti ittici o degli impianti di lavorazione del pesce, nonostante l'ampia diffusione della Lattococcosi, il che appare rassicurante. Il sospettato ruolo zoonosico dei ceppi ittici di *L. garvieae* andrebbe pertanto ridimensionato.

Non sembrano al momento sussistere rischi per la salute pubblica legati alle infezioni da cocchi Gram positivi dei pesci in Europa occidentale, essendo indenne da *S. iniae*. In ogni caso, queste infezioni non vengono trasmesse all'uomo con il consumo di prodotti ittici.

## EPIDEMIOLOGIA DI *LACTOCOCCUS GARVIEAE*

### *LACTOCOCCUS GARVIEAE* EPIDEMIOLOGY

Eldar A.

*Kimron Veterinary Institute – Beit Dagan – Israele*

La storia di *Lactococcus garvieae* è alquanto insolita. La sua descrizione iniziale risale alla prima metà degli anni '80, quando fu isolato da un caso di mastite sub-clinica in Inghilterra. Questo è uno dei pochi casi dove tale germe viene riportato in bibliografia, sia come agente mastidogeno, sia in altri contesti.

Il rinascimento di questo batterio avviene durante la prima metà degli anni '90, quando viene associato a sepsi generalizzata di trote iridea allevate in Italia e Spagna. Un'indagine retrospettiva indica come *L. garvieae* non dovrebbe essere considerato un nuovo patogeno dei pesci. Analisi contemporanea di materiale archiviato mostra che *L. garvieae* è presente, in Estremo Oriente, come patogeno dei pesci già da oltre 50 anni. Erroneamente, il batterio non fu mai identificato con termini scientifici appropriati o fu mal identificato come *Enterococcus seriolicida*.

I vari ceppi di *L. garvieae* costituiscono un gruppo geneticamente omogeneo; nonostante l'alta omologia genetica (oltre 90%), la diversificazione fenotipica è alta (biochimicamente, si sono distinti almeno 13 biograppi). Alla fine degli anni '90, un'indagine epidemiologica (RFLP ribotyping) ha dimostrato che l'evoluzione dei ceppi italiani (dei quali si è ipotizzata una probabile origine giapponese) e spagnoli, ha seguito dei percorsi autonomi. Questi dati sono stati grosso modo confermati da tecniche complementari (PFGE, RAPD).

Negli ultimi quattro anni si è potuto avere una visione alquanto più ampia sul raggruppamento epidemiologico dei vari ceppi di *L. garvieae*. I dati dimostrano che la scissione tra ceppi italiani e spagnoli è mantenuta sia a livello fenotipico, sia genetico, sia sierologico. Di contro, la popolazione dei ceppi francesi di *L. garvieae* appare alquanto eterogenea. Questo dato è probabilmente legato al processo evolutivo che, in questo paese, non è ancora affermato.

## METODI BIOMOLECOLARI PER L'IDENTIFICAZIONE DELLE INFEZIONI DA GRAM POSITIVI NEI PESCI

### BIOMOLECULAR METHODS FOR THE DETECTION OF GRAM POSITIVE COCCAL INFECTIONS OF FISH

Zlotkin A.,<sup>1</sup> Eldar A.,<sup>3</sup> Ghittino C.,<sup>4</sup> Bercovier H.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Infectious Diseases Research Lab, Sheba Medical Center, Tel-Hashome, Israel;*

<sup>2</sup>*Department of Clinical Microbiology, The Hebrew University Hadassah Medical School, Jerusalem 91120, Israel;* <sup>3</sup> *Department of Poultry and Fish Diseases, The Kimron Veterinary Institute, Beit Dagan 50250, Israel;* <sup>4</sup> *State Veterinary Institute, 06126 Perugia, Italy*

With the development of intensive aquaculture, streptococcal infections of fish have become a major problem worldwide. The symptomatologies of fish infected by the various gram-positive cocci pathogenic for fish are similar and do not allow a rapid identification of the agent responsible for the disease (Bercovier et. al. 1997).

One of the aims in our study was to establish a reliable technique to identify the different gram-positive pathogens that cause diseases in aquaculture. The molecular strategy we decided to use, based on PCR amplification of sequences from the 16SrDNA using species-specific primers, showed high sensitivity and specificity on the species level. A PCR assay for the identification of *L. garvieae* was developed and resulted in an amplified fragment of 1,100 bp in size. The PCR assay was shown to be specific to *L. garvieae*. The PCR assay was positive for all the *L. garvieae* strains tested, which originated from three different continents (Asia, Australia, and Europe). The PCR assay was negative for the phenotypically similar *L. lactis* and for all the other fish pathogens tested, including *Streptococcus iniae* and *Aeromonas salmonicida*. The PCR assay was applied to plasma obtained from diseased animals and was found sensitive enough to detect bacteria from 1 µl of plasma, and in-vitro was positive (presence of a specific 1,100-bp band) down to the dilution corresponding to 4 bacteria (4 CFU) per reaction tube. From these data, it can be concluded that the proposed PCR assay can be useful not only for diagnostic but also for epidemiological surveys and could be an efficient tool to establish preventive measures on time (antibiotic prophylaxis, vaccination). The PCR assay that we have developed is a convenient, fast, and simple technique that can be accomplished in 5 h and that can be applied not only to the specific identification of pathogen but also to the surveillance of pathogenic infections in aquacultures (Zlotkin et. al. 1998a).

Today we got primers for the detection and identification of the following gram-positive cocci fish pathogens: *Lactococcus garvieae* (Zlotkin et. al. 1998a), *Streptococcus iniae* (Zlotkin et. al. 1998b), *Vagococcus salmoninarum* (data not shown), *S. difficile* (Berridge et. al. 2001) and *S. parauberis* (Hassan et. al. 2001).

## LEGISLAZIONE EUROPEA E TERAPIA

### EUROPEAN LEGISLATION AND THERAPY

Malvisi J.

*Università di Perugia – Facoltà di Medicina Veterinaria, Via S. Costanzo, 4 – 06126 Perugia*

Le setticemie batteriche, unitamente alle malattie batteriche esterne ed alle ectoparassitosi, rappresentano uno fra i maggiori rischi sanitari sia per la piscicoltura dulciacquicola che marina. In caso di inapplicabilità della profilassi vaccinale o se non prontamente diagnosticate e curate, queste patologie possono determinare cospicue mortalità, con conseguenti danni economici. Per il loro controllo, pertanto, l'impiego di farmaci risulta il più delle volte indispensabile, se non inevitabile. Di recente, negli allevamenti ittici europei sono comparse nuove setticemie batteriche, di difficile terapia per l'assenza di molecole efficaci ammesse dalla legislazione: è il caso della lattococcosi sostenuta da *Lactococcus garvieae*. Malgrado alcune registrazioni avvenute nel corso dell'ultimo decennio, che hanno in parte aggiornato lo storico lacunoso elenco degli antibiotici consentiti in acquacoltura, la necessità di disporre di moderne molecole per la terapia antibatterica nell'Unione Europea appare evidente.

Le categorie di principi attivi autorizzati per os in gran parte degli stati membri comprendono beta-lattamine (amoxicillina), tetraciline (ossitetraciclina), sulfamidici (sulfa-trimethoprim) e chinoloni (flumequine, acido ossolinico, sarafloxacin). Recentemente, e per ora nel solo Regno Unito, paese con il più alto numero di molecole registrate, è stato autorizzato anche l'uso del florfenicolo. In Europa meridionale, e soprattutto in Italia, è preoccupante il fatto che la terapia della lattococcosi, malattia che parallelamente al riscaldamento generale delle acque, ha determinato un calo del 20% della produzione annua di trote iridea, non siano stati registrati principi attivi d'elezione contro i germi Gram positivi (eritromicina). In questi casi, per ovviare alla carenza normativa ed assicurare ai pesci allevati un adeguato benessere, è possibile tuttavia ricorrere alla ricetta veterinaria in deroga, con imposizione di un tempo di sospensione minimo di 500 gradi giorno.

IMMUNOLOGIA DI *LACTOCOCCUS GARVIEAE*: RISPOSTA UMORALE E CELLULO-MEDIATA

IMMUNOLOGY OF *LACTOCOCCUS GARVIEAE*: HUMORAL AND CELL-MEDIATED RESPONSE

Chilmonczyk S.,<sup>1</sup> Messiaen S.,<sup>1</sup> Eyngor M.,<sup>2</sup> Eldar A.,<sup>2</sup> Zlotkin A.,<sup>2</sup> Prearo M.,<sup>3</sup> Ghittino C.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Unité de Virologie et Immunologie Moléculaires, INRA, Jouy-en-Josas, 78352 France; <sup>2</sup>Kimron Veterinary Institute, P.O. Box 12, Beit-Dagan 50250, Israel; <sup>3</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, via Bologna 148, 10154 Torino, Italy; <sup>4</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria, Via G. Salvemini 1, 06126 Perugia, Italy

Streptococcal infections cause serious loss in fish farming. In Mediterranean countries *Lactococcus garvieae* and *Streptococcus iniae* are considered as the main pathogens. Both bacteria are able to penetrate and proliferate within various fish cells. Immune cells are specifically involved in the pathogenic process. Immunological status and cell functions assays presented here were obtained from:

- experimental infections performed either in-vivo or in-vitro on rainbow trout or rainbow trout leukocytes;
- vaccination assays performed at INRA fish facilities.

In-vivo, intraperitoneal injections of L.g induced strong mortalities occurring between day 3 and 6 or day 4 and 7 p.i. Depending on the assays, 75% to 90% mortality was recorded.

During the course of the disease, 3 characteristic chronological phases were observed: infectious, mortality and recovery phases. A kinetic study of the leukocyte populations collected from blood and pronephros was performed including the infection phase and the recovery phase of the experimental disease.

Infectious phase is characterized by a strong leucopenia occurring within blood and pronephros. Strong quantitative (number of cells) and qualitative (cell type) modifications may occur. The acute and the recovery phases of the disease are characterized by changes of the leukocyte sub-populations. Depending on bacteria strains, susceptibility of blood or pronephros cells differs greatly. During the recovery phase, yields of collected cells increase rapidly.

Apoptosis and cellular immune mechanisms (phagocytosis, oxidative burst, cell proliferation) were analyzed.

We have demonstrated that streptococci induce apoptosis in leukocyte sub-populations. Macrophages play a crucial role during the initial steps of streptococcal infection. Bacteria are easily phagocytized but the engulfment of fish streptococci within the macrophages is not followed by the destruction of ingested bacteria.

In-vitro, oxidative burst mechanisms were inhibited or delayed, depending on bacteria strains.

During the recovery phase in-situ cell proliferation was demonstrated in pronephros of fish which overcome the infection.

Vaccination with killed bacteria induced a strong protection versus challenge. Preliminary data dealing with trout humoral response showed that vaccinated trout displayed a low level of antibody. The challenge induces a secondary response characterized by a rapid enhancement of the antibody titres.

Our results suggest that streptococci develop an anti-host strategy based on apoptotic killing of leukocytes and strong or delayed inhibition of the oxidative burst that allow bacteria to invade fish and to reach safely target organs.

## CONTROLLO E PROFILASSI VACCINALE DELLA LATTOCOCCOSI

### CONTROL AND VACCINATION AGAINST LACTOCOCCOSIS

Prearo M., Pedron C.,<sup>1</sup> Sarti M.<sup>2</sup>

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Via Bologna, 148 – 10154 Torino;*<sup>1</sup> *Az. Agr. Mandelli s.s., Via del Porto, 26 – 27023 Cassolnovo (PV);*<sup>2</sup> *Skretting, Fraz. S. Zeno – 37060 Mozzecane (VR)*

Il controllo della lattococcosi risulta essere particolarmente difficile, in quanto non esistono nel nostro Paese prodotti antibiotici registrati altamente efficaci per tale patologia. Inoltre, è da tenere in considerazione, come la terapia mediante antibiotici somministrati per via orale, risulti spesso inefficace per l'insorgenza di una precoce anoressia, di fenomeni di antibiotico-resistenza e per la comparsa di facili e frequenti ricadute. Nel corso dell'ultimo decennio, si è potuto vedere come gli antibiogrammi effettuati sugli isolati di *Lactococcus garvieae*, risultino diversi, con presenza di resistenze sempre maggiori alle più comuni molecole terapeutiche. Con la comparsa della patologia, gli antibiotici normalmente consentiti (ossitetraciclina) e quelli di elezione (eritromicina) risultavano entrambi efficaci, sia *in vitro* che *in vivo*. Molto velocemente si sono riscontrati i primi insuccessi terapeutici con l'ossitetraciclina, dovuti all'instaurarsi di una resistenza del germe al trattamento. L'eritromicina rimane ancora un antibiotico efficace anche se in alcuni casi si verificano delle resistenze ben evidenti *in vitro*. L'uso dell'amoxicillina ha portato scarsi risultati positivi nella terapia della lattococcosi; attualmente l'eritromicina, anche se con numerose riserve, resta un importante presidio nella terapia, insieme alla ritrovata efficacia dell'ossitetraciclina, non più utilizzata ormai da diversi anni. Attualmente, per quasi tutti i ceppi di *L. garvieae* isolati negli ultimi due anni sul territorio italiano, gli antibiogrammi forniscono dei responsi sempre più scoraggianti, tanto da far intraprendere, da parte dei produttori, una campagna di vaccinazione che comunque nell'anno in corso ha stentato a decollare.

La profilassi delle malattie batteriche mediante vaccinazione, risulta essere una pratica utilizzata anche in acquacoltura. Attualmente il sistema maggiormente impiegato è quello per immersione, ma la vaccinazione tramite iniezione endoperitoneale appare sempre più percorribile, soprattutto per alcune patologie della trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*) quali la lattococcosi, sostenuta da *L. garvieae*, e la streptococcosi, causata da *Streptococcus iniae*. In Italia tale pratica non è radicata, vista la mancanza di vaccini registrati contro queste patologie. È possibile comunque effettuarla, impiegando vaccini stabulogeni prodotti dagli Istituti Zooprofilattici Sperimentali. Attualmente un unico Istituto ha il permesso ministeriale di produrre vaccini stabulogeni contro la lattococcosi dei pesci, ma già altri Istituti hanno o stanno facendo domanda per tale produzione.

Gli studi vaccinali sono iniziati nel 1992 in Israele contro *S. iniae* ed in Italia nel 1994, contro *L. garvieae*. Sono stati testati vaccini inattivati a base di cellule batteriche intere (bacterin), con un titolo di  $1,5 \times 10^{10}$  cellule/ml, e vaccini adiuvati con oli minerali a diversa formulazione. L'efficacia della vaccinazione mediante bacterin è decisamente inferiore rispetto a quella dei vaccini adiuvati (rispettivamente 3 e 6 mesi circa). Nei primi anni di sperimentazione dei vaccini in oggetto in Italia, erano utilizzati esclusivamente quelli denominati "bacterin", cioè senza nessun adiuvante. Con tale utilizzo, non si avevano incidenti vaccinali di mortalità nei primi 4-5 giorni post-iniezione, l'insorgenza dell'immunità era evidente già dalla seconda settimana, ma l'efficacia era ridotta nel tempo, tale da non coprire l'intero periodo di maggior apice della malattia (giugno-

ottobre). Successivamente, con l'adattamento della patologia alle nostre condizioni e quindi con un allargamento del periodo di maggiore mortalità da maggio fino a novembre inoltrato, il vaccino con bacterin è risultato ancora più di scarsa utilità nella gestione della malattia. Lo studio di formulazioni variamente adjuvate, ha portato ad un netto miglioramento della durata dell'immunità, con scarse ricadute se non verso fine stagione. L'uso di oli minerali per potenziare l'azione immunizzante del vaccino ha portato comunque all'insorgenza di numerosi incidenti di percorso che, a seconda delle partite, potevano essere anche decisamente importanti. Prima fra tutti, sempre presente in misura più o meno evidente, è la comparsa di una mortalità significativa nei primi giorni dopo l'inoculazione (fino anche al 5%) con animali che faticavano a riprendere le normali funzioni vitali. Inoltre, soprattutto negli ultimi anni, con l'uso di quantità maggiori di lotti sperimentali, non sempre inoculati in modo consono dagli operatori, si è affacciato un nuovo problema, molto sentito soprattutto dai trasformatori; infatti, si è verificata l'insorgenza, in un numero molto elevato di casi, di tenaci aderenze dei visceri, particolarmente problematica nel caso della trasformazioni in filetti o in trote sviscerate. Oltre all'aderenza dei visceri, in un numero inferiore di soggetti, ma comunque sempre molto elevato (a seconda delle partite), si presentava la comparsa di aree di necrosi nel punto di inoculo, che a volte si espandevano lungo la parete ventrale dei pesci. Questo portava ad una evidente perdita economica in quanto nei casi più eclatanti doveva essere distrutto il pesce colpito, mentre in quelli meno gravi, bisognava operare una profonda toelettatura del filetto, con perdite sulla resa ed un maggior dispendio di tempo da parte delle operatrici. Purtroppo è stato molto difficile poter far combaciare le esigenze di allevamento, con una induzione di uno stato immunitario sufficientemente valido e prolungato, con quelle della produzione, dove doveva arrivare al tavolo di trasformazione del pesce privo di tali difetti. Nel corso degli ultimi due anni è stata studiata una nuova formulazione adjuvante, utilizzando dei prodotti in commercio ed usati per altre specie. Dai primi risultati sembra che l'efficacia sia abbastanza paragonabile a quella dimostrata con il vaccino adjuvato classico, ma si sono ottenuti dei risultati estremamente confortanti dal punto di vista della produzione. Infatti, l'utilizzo di tale prodotto ha consentito in prove di confronto di filettatura, di ottenere un punteggio decisamente superiore rispetto a quello ottenuto con il classico. Infatti, l'uso di due formulazioni diverse dello stesso prodotto, hanno portato ad ottenere pesci con minori aderenze dei visceri, facilmente asportabili alla filettatura; inoltre i visceri sono apparsi meno arrossati, ma soprattutto la percentuale delle necrosi muscolari ventrali è apparsa decisamente inferiore e di entità meno grave. E' ancora presto per poter dichiarare di avere trovato la formulazione perfetta, ma i progressi registrati sono alquanto confortanti.

Quindi, attualmente l'utilizzo della vaccinazione con l'uno o l'altro prodotto, deve essere condotta nell'ambito di una corretta gestione dell'allevamento. Infatti non sempre l'uso del vaccino adjuvate può risultare la risposta vincente. La scelta del tipo di vaccino deve essere fatta valutando la movimentazione del pesce che si effettua dall'allevamento alla produzione di lavoro, dalla gestione dell'allevamento stesso, dall'andamento climatico e dal regime idrico e da altri fattori, tutti valutati di comune accordo con l'allevatore ed il veterinario d'azienda. In molte realtà, dove esistono regimi idrici diversi, con acque di pozzo che possono essere utilizzate anche nel periodo estivo per i soggetti adulti, l'utilizzo di vaccino adjuvate rappresenta uno spreco oltre che un danno per le mortalità che si devono subire e per le problematiche di produzione. D'altro canto, in situazioni particolari, dove il pesce deve presentare minori difetti possibile alla lavorazione o in casi di lotti di riproduttori, dove le aderenze portano ad un danno economico notevole in fatto di produttività, è ipotizzabile e percorribile una doppia vaccinazione con vaccino bacterin oppure l'uso come richiamo di vaccini ad uso orale, che attualmente sono allo studio.



Infine vengono messe a confronto le tecniche di somministrazione del vaccino mediante iniezione intraperitoneale effettuata manualmente e tramite l'uso di macchine vaccinatrici (sistema semiautomatico). Per entrambi i sistemi risulta necessario effettuare una sedazione preventiva del pesce, allo scopo di limitarne i movimenti, mediante l'uso di anestetici per l'acquacoltura (MS 222). Il sistema manuale consiste nell'impiego di tavoli da lavoro *ad hoc*, tali da consentire agli operatori una rapida manipolazione del pesce, e siringhe autocaricanti per la somministrazione della dose vaccinale (0,1 o 0,2 ml/capo). Il sistema semiautomatico invece consiste nell'impiego di 2, 4 o più vie, in cui l'operatore inserisce il pesce in appositi scomparti, nei quali i soggetti vengono bloccati ed una siringa autocaricante inietta loro la dose di vaccino stabilita. I principali vantaggi della vaccinazione manuale sono risultati essere una possibilità di trattare contemporaneamente pesci di taglie differenti, ma soprattutto una minore incidenza di soggetti non o mal vaccinati. Quelli della vaccinazione semiautomatica invece sono risultati essere una maggior velocità di esecuzione impiegando minore manodopera ed assenza di incidenti agli operatori.

## ESPERIENZE SULLA VACCINAZIONE ORALE

### STUDIES OF ORAL VACCINATION

Galeotti M.

*Università di Udine; Facoltà di Medicina Veterinaria, Dipartimento di Scienze della Produzione Animale, Via delle Scienze, 206 – 33100 Udine*

Il controllo della lattococcosi sostenuta da *Lactococcus garvieae* in trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*) viene attuato osservando una corretta gestione sanitaria dell'allevamento e mediante l'impiego di vaccini stabulogeni somministrati tramite iniezione. La vaccinazione mediante inoculo intraperitoneale di batteri formolati in trota iridea si è dimostrata efficace nel corso di prove sperimentali effettuate in Spagna, in Israele, in Italia. Tali osservazioni sono supportate dal riscontro di una tangibile minore suscettibilità alla malattia in trote vaccinate nei mesi che precedono la stagione estiva.

A scapito della sua diffusione ed efficacia protettiva, la vaccinazione intraperitoneale presenta alcuni aspetti negativi, fra cui annoveriamo l'alto costo (in termini di tempo e manodopera), lo stress dei soggetti trattati, la possibile comparsa di alterazioni infiammatorie ed eventuali infezioni batteriche in corrispondenza del sito di inoculo. Per tale motivo sono state avviate sperimentazioni finalizzate a verificare l'efficacia di altre vie di somministrazione del vaccino, e in particolare quella orale. Recentemente vaccini orali per le infezioni da *L. garvieae* in *Seriola quinqueradiata*, sono stati prodotti e commercializzati in Giappone.

La ricerca in oggetto consiste in uno studio preliminare sulla vaccinazione orale in trote iridee, mediante la somministrazione di batteri formolati con la tecnica dell'intubazione orale, in alternativa, con l'integrazione del vaccino al mangime. In entrambi i casi sono state condotte valutazioni finalizzate ad approfondire aspetti quali:

- la permanenza del vaccino nel tratto digerente e l'assorbimento nei vari tratti dello stesso, mediante tecniche istologiche e immunoistochimiche;
- la variazione della risposta immunitaria specifica e aspecifica, nelle fasi successive alla vaccinazione, mediante misurazione di alcuni parametri quali lisozima, proteine, immunoglobuline specifiche per *L. garvieae*, nel siero e nel muco intestinale dei soggetti trattati.

I risultati preliminari delle vaccinazioni condotte vengono presentati, comparando i due diversi metodi di somministrazione per *os*.

## ASPETTI PRATICI NEL CONTROLLO DELLA LATTOCOCCOSI SUL TERRITORIO

### PRACTICAL CONSIDERATIONS ON THE DISEASE CONTROL IN THE FIELD

Fabris A.

*Associazione Piscicoltori Italiani, Via del Perlar, 37/A - 37135 Verona*

La Lattococcosi (sostenuta da *Lactococcus garvieae*) dopo le prime segnalazioni degli inizi anni '90 si è diffusa a macchia d'olio nelle troticolture italiane, diventando uno dei principali fattori responsabili della diminuzione della produzione di trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*) in Italia.

Le perdite economiche sono ingenti in considerazione della taglia dei soggetti colpiti e della elevata mortalità causata.

Il controllo della lattococcosi deve necessariamente prevedere azioni sulla gestione delle risorse idriche e l'adozione di norme igienico – sanitarie mirate a ridurre il rischio di diffusione, coadiuvate dalla terapia e dalla profilassi vaccinale.

La formazione degli operatori è lo strumento d'elezione per sviluppare tecniche gestionali d'allevamento idonee a ridurre l'impatto della patologia.

La disponibilità di chemioterapici antibatterici e di vaccini attivi nei confronti di *Lactococcus garvieae* è ridotta anche per aspetti legati alla normativa che regola l'utilizzo dei farmaci veterinari.

La grave situazione creatasi nell'estate 2003, in concomitanza alle eccezionali condizioni climatiche, ha indotto l'Associazione Piscicoltori Italiani, sollecitata dagli operatori del comparto, a coordinare le diverse professionalità coinvolte allevatori, tecnici e veterinari aziendali, istituti zooprofilattici, università allo scopo di dare risposta alle esigenze della troticoltura italiana con proposte concrete a breve, medio e lungo termine che attraverso una condotta responsabile portino alla riduzione dell'incidenza della lattococcosi.

I primi risultati ottenuti con questa iniziativa sono stati, una maggiore integrazione tra le istituzioni scientifiche e il comparto produttivo, lo sviluppo di un protocollo vaccinale, l'autorizzazione all'importazione di un anestetico ai fini della vaccinazione intraperitoneale con vaccino stabulogeno nei confronti della Lattococcosi.

## ISOLAMENTO DEL VIRUS DELLA SETTICEMIA EMORRAGICA VIRALE DA PERSICI (*PERCA FLUVIATILIS*) SELVATICI ED INFEZIONE SPERIMENTALE IN TROTA IRIDEA (*ONCORHYNCHUS MYKISS*)

Selli L.<sup>1</sup>, Lot G.<sup>2</sup>, Cappellozza E.<sup>1</sup>, Quartesan R.<sup>1</sup>, Giacometti P.<sup>1</sup>, Manfrin A.<sup>1</sup>, Vascellari M.<sup>1</sup>, Bovo G.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Via dell'Università 11 - 35020 Legnaro (PD); <sup>2</sup> ASL n. 7., Pieve di Soligo (TV)

Nel corso dell'inverno 2004, in una trotilcoltura della regione Veneto sottoposta da circa 10 anni ad un piano regionale di sorveglianza nei confronti delle malattie virali previste dal DPR 263/97 e risultata costantemente negativa, oltre alle trote è stato prelevato, dal servizio veterinario ufficiale, un campione di persici (*Perca fluviatilis*), in quanto si era verificata una massiccia invasione, di questa specie, a monte dell'impianto. Sia dai campioni di trota che da quelli di persico, è stato isolato un ceppo virale identificato, tramite IF, come virus della setticemia emorragica virale (SEV).

Al fine di approfondire alcuni aspetti epidemiologici è stato programmato un ulteriore campionamento.

Nel corso del secondo prelievo, eseguito a distanza di circa 20 giorni dal primo, è stata confermata, in prossimità delle due griglie poste all'entrata dell'acqua di alimentazione, la presenza di un elevato numero di persici di circa 6-8 cm. di lunghezza. Secondo il titolare dell'impianto, i persici potevano provenire da un piccolo lago naturale situato a circa duemila metri a monte dell'azienda e ad essa collegato tramite un condotto di troppo pieno che, in caso di piogge continue, raccoglie l'acqua in tracimazione e la convoglia in parte nel canale che alimenta la trotilcoltura. I persici giungevano in prossimità delle griglie, in condizioni apparentemente normali, ma morivano in pochi giorni costringendo il personale dell'allevamento ad una asportazione giornaliera di centinaia di soggetti morti. Al momento del secondo prelievo nei persici era ancora presente una modesta mortalità, mentre la popolazione di trote non evidenziava alcuna sintomatologia significativa. Il secondo campionamento ha confermato la positività virologica del primo prelievo.

Con lo scopo di verificare la patogenicità dell'agente isolato è stata programmata un'infezione sperimentale nei confronti di avannotti di trota iridea, utilizzando il ceppo isolato da *Perca fluviatilis* e, come controllo positivo, un ceppo patogeno di SEV isolato, in precedenza, da trota iridea.

Sono stati infettati, mediante immersione di 2 ore in bagno infettante con virus omologo ed eterologo, due gruppi di trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*). I gruppi di controllo sono stati trattati con identica modalità con l'esclusione del patogeno.

Al termine dell'infezione gli animali sono stati trasferiti in acquari cilindrici di circa 60 litri riforniti con acqua di rete dechlorata e termostata a 12° C con un ricambio idrico di circa 40 litri per ora.

Nel corso della sperimentazione gli animali sono stati alimentati regolarmente e controllati giornalmente per l'evidenziazione di eventuale sintomatologia, fino al 30° giorno p. i.

A partire dal 6° giorno, in entrambe i gruppi infettati, è comparsa una mortalità di tipo acuto che ha causato la morte del 100 % dei soggetti, associata a sintomi e rilievi anatomico-patologici caratteristici della SEV; inoltre anche le indagini istopatologiche effettuate dai diversi organi hanno evidenziato i quadri tipici della malattia.

## VACCINAZIONE DI TROTE IRIDEA (*ONCORHYNCHUS MYKISS*) CON UN VACCINO A DNA BIVALENTE CONTRO LA SETTICEMIA EMORRAGICA VIRALE E LA NECROSI EMATOPOIETICA INFETTIVA

Delgado L.<sup>1</sup>, Einer-Jensen K.<sup>2</sup>, Lorenzen N.<sup>2</sup>, Bovo G.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Via dell'Università, 11 – 35020 Legnaro (PD); <sup>2</sup> Danish Veterinary Institute, Århus, Denmark

La setticemia emorragica virale (SEV) e la necrosi ematopoietica infettiva (NEI) rappresentano le principali patologie virali in grado di causare gravi perdite in alcune specie di salmonidi d'allevamento d'acqua dolce. I metodi di controllo attualmente disponibili si basano sull'impiego della profilassi diretta mediante eradicazione dell'agente eziologico dalle aziende e dal territorio.

Questi metodi, di difficile gestione, richiedono notevole esperienza ed esigono una costante applicazione di rigide misure igienico sanitarie che, se non applicate correttamente, non sono in grado di garantire il mantenimento dello *status* di aziende indenni. Per questo motivo, da oltre un trentennio, si sta tentando di individuare un metodo alternativo di controllo ed in particolare l'approntamento di un metodo di immunizzazione efficace.

Le esperienze più recenti hanno evidenziato che, in acquacoltura, i vaccini a DNA, differentemente da quanto ottenuto, negli ultimi anni, con i vaccini ricombinanti, possono fornire buoni risultati, in particolare nei confronti dei virus appartenenti alla famiglia Rhabdoviridae.

Gli autori presentano i risultati ottenuti nel corso di un'esperienza di vaccinazione di trote iridea (*Oncorhynchus mykiss*) contro la SEV e la NEI, con l'impiego di un vaccino a DNA bivalente.

La vaccinazione è stata eseguita tramite inoculazione i.m. in soggetti di circa 5 grammi, suddivisi in vari gruppi trattati con: A) - plasmide contenente il gene codificante per la glicoproteina del virus della SEV; B) - plasmide contenente il gene codificante per la glicoproteina del virus della NEI; C) - miscela dei due plasmidi; D) - plasmide privo dei geni codificanti per entrambe le glicoproteine; soluzione fisiologica.

Dopo la vaccinazione i diversi gruppi sono stati distribuiti in acquari di circa 50 litri, alimentati con acqua di rete dechlorata e termostata a 10-11° C con un ricambio di circa 40 litri per ora.

A 80 giorni dalla vaccinazione i vari gruppi sono stati cimentati rispettivamente con un ceppo patogeno del virus della SEV (234/99); un ceppo patogeno della NEI (343/1) nonché una sospensione contenente entrambi gli agenti virali. Nell'indagine sono stati inoltre inseriti i necessari test di controllo.

La mortalità è stata registrata per oltre 30 giorni dall'infezione. I risultati ottenuti confermano, oltre alla specificità dei plasmidi impiegati, quanto già noto sull'efficacia della vaccinazione a DNA nei confronti dei Rhabdovirus dei pesci che, in questa esperienza ha evidenziato un'ottima protezione con valori di RPS compresi tra 85 e 96%.

## STUDIO SULLA “TEMPERATURA-DIPENDENZA” DI DUE CEPPI DI *BETANODAVIRUS*

Ciulli S., Galletti E., Natale A., Battilani M., Prosperi S.

*Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria, Via Tolara di Sopra, 50 – 40064 Ozzano Emilia (BO).*

L'Encefalo Retinopatia Virale (ERV) è una patologia cosmopolita responsabile di sintomatologia nervosa e mortalità in larve ed avannotti di varie specie ittiche marine. La malattia è causata da virus, genere *Betanodavirus*, famiglia Nodaviridae, di piccole dimensioni a simmetria icosaedrica contenenti due RNA a singolo filamento: l'RNA1 codificante per la RNA-polimerasi e l'RNA2 codificante per la proteina del capsido. Fra i *Betanodavirus* riconosciamo 4 genotipi che differiscono anche per alcune caratteristiche biologiche fra le quali il range di temperatura di crescita. Questo lavoro ha lo scopo di analizzare l'effetto della temperatura sulla replicazione virale del *Betanodavirus* e di indagarne le cause. Due ceppi virali isolati da diverse specie ittiche e in diverse aree geografiche sono stati sottoposti a replicazione virale su SSN-1 a diverse temperature. Sono stati utilizzati il ceppo It/351/Sb isolato da *Dicentrarchus labrax* in un focolaio nel Medio Adriatico nell'estate 2001 e il ceppo It/1565/An isolato da *Atractoscion nobilis* in un focolaio del 2002 nel sud della California. Dall'analisi filogenetica delle sequenze dell'RNA2 si è evidenziato che entrambi i ceppi appartengono al genotipo RGNNV. I due ceppi hanno manifestato, nella prova delle temperature un diverso range di crescita, poiché la temperatura di 30° C si è rivelata permissiva per la crescita del solo ceppo italiano, entrambi i virus hanno dato replicazione virale fra 15° C e 25° C, mentre a 10° C non si è evidenziata crescita virale anche in dipendenza della morte cellulare dovuta alla temperatura non permissiva per questa linea cellulare. Questo sistema d'osservazione *in vitro* si è rivelato idoneo allo studio dell'effetto della temperatura sulla crescita virale evidenziando un comportamento simile a quello osservato in natura. In particolare la crescita a 15° C si è evidenziata solo dopo un lungo periodo di latenza, nel quale le cellule, a seguito della temperatura, hanno manifestato evidente sofferenza cellulare. Così in natura gli effetti dell'intensa replicazione virale a basse temperature sono stati osservati solo in seguito a forti effetti stressanti. Diversi range di temperatura di crescita erano già stati evidenziati da altri Autori con particolare riferimento ad ampie differenze fra ceppi appartenenti a genotipi diversi, nel nostro caso è stato possibile evidenziare range diversi anche fra ceppi appartenenti allo stesso genotipo, ma isolati da specie ittiche con habitat diversi. Queste differenze sembrerebbero riflettere proprio il range di temperatura al quale normalmente queste specie ittiche vivono. Il branzino bianco (*Atractoscion nobilis*) è una specie del Pacifico, allevata nel sud della California a temperature tra 12,5° C e 25,5° C e l'infezione da *Betanodavirus* è stata segnalata con temperature tra 15° e 24° C. Il branzino europeo (*Dicentrarchus labrax*) è allevato ad un range di temperature fra 18° C e 24° C, anche se in allevamento semi-estensivo le temperature estive raggiungono frequentemente i 28°-30° C. I focolai di ERV in Italia si osservano generalmente con temperature dell'acqua superiori ai 25° C. In analogia con quanto osservato in altri RNA virus a polarità positiva è stato ipotizzato che la diversa capacità replicativa dei due ceppi fosse da attribuire alla struttura della RNA polimerasi codificata dall'RNA1 del virus. In seguito al sequenziamento di un ampio frammento dell'RNA1 dei due ceppi analizzati si è evidenziata una elevata similarità sia a livello nucleotidico (99,6%) che aminoacidico (100%) delle due sequenze che suggerisce che questa diversa capacità di crescita non è da attribuire a questa parte della proteina. L'analisi di frammenti di dimensioni maggiori ed ulteriori studi di caratterizzazione dei due ceppi virali potranno in futuro permettere di chiarire meglio le basi genetiche della temperatura-dipendenza.

**L'APPLICAZIONE DI PARAMETRI MORFOLOGICI (CIRCOLARITA') E FUNZIONALI (ROS) PERMETTE DI MONITORARE L'AZIONE DELLO STRESS SULLA FAGOCITOSI DI EMOCITI DI MITILI (*MYTILUS GALLOPROVINCIALIS*, LMK 1819)**

Mosca F., Narcisi V., Marozzi S., Finoia M.G.\*, Tiscar P.G.

*Dipartimento di Scienze Biomediche Comparate, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Teramo, Teramo; \* Istituto Centrale per la Ricerca scientifica e tecnologica Applicata al Mare, V. di Casalotti 300, 00166, Roma*

La fagocitosi emocitaria costituisce il principale meccanismo immunitario dei molluschi bivalvi marini e l'attività inibente esercitata dallo stress su alcune importanti proprietà morfo-funzionali degli emociti potrebbe costituire, come ipotizzato in letteratura, un fattore predisponente in episodi di mortalità, sia nell'ambito degli allevamenti che delle risorse alieutiche. In termini morfologici, la fagocitosi comporta un'attivazione ameboide degli emociti, conferendo loro proprietà chemiotattiche, locomotorie e di inglobamento del not-self, mentre la sintesi di specie reattive dell'ossigeno (ROS) rappresenta un processo di attivazione funzionale rivolto alla degradazione del materiale fagocitato. Lo stress può inibire tali proprietà morfo-funzionali e modulare negativamente la risposta immunitaria degli organismi con ripercussioni sul loro stato generale di salute, sia in termini di produttività che di qualità igienico-sanitarie. La valutazione delle condizioni morfo-funzionali degli emociti necessita, quindi, di parametri in grado di fornire informazioni sullo stato di efficienza del sistema immunitario cellulare, in maniera precoce, rapida e strumentalmente oggettiva. La circolarità e la sintesi di ROS, misurati mediante analizzatore di vitalità cellulare (Vi-cell, Beckman Coulter), chemiluminescenza in micrometodo (Fusion, Packard) e citometria a flusso (XL Epics, Beckman Coulter) potrebbero costituire parametri idonei nel misurare le modulazioni che l'omeostasi immunitaria subisce a causa dei fattori di stress. Lo studio della circolarità emocitaria in mitili mantenuti a 18° C ha infatti evidenziato un valore medio di 0,76, testimoniando una conformazione tendenzialmente rotondeggiante in cellule che si trovano in una condizione di relativa normalità e di inattività. Lo stimolo fagocitario, applicato in vitro mediante batteri e lieviti, ha invece indotto una riduzione significativa del valore medio di circolarità (0,66) imputabile ad una attivazione ameboide degli emociti. Lo stress termico effettuato in vivo (40° C per 1 ora) ha determinato un aumento della circolarità emocitaria media (0,84) e la maggiore rotondità cellulare potrebbe trovare spiegazioni nell'attività inibente dello stress a carico del citoscheletro, struttura molto importante nel modulare la conformazione di cellule fagocitarie. A dimostrazione di tale effetto inibente, gli emociti prelevati da mitili stressati e stimolati alla fagocitosi, non hanno subito alcuna attivazione ameboide, mantenendo alti valori di circolarità (0,81). L'impatto negativo dello stress è stato evidenziato anche nelle prove in luminescenza, in quanto gli emociti di mitili mantenuti a 18° C mostravano, durante la fagocitosi di batteri e lieviti, una risposta superiore nei confronti del segnale rilevato in cellule provenienti da organismi stressati. Le prove condotte in citometria a flusso hanno confermato la modulazione stress-indotta dei parametri morfologici (complessità strutturale) e funzionali (sintesi di ROS). In conclusione, la sperimentazione effettuata ha evidenziato l'impatto negativo dello stress sulle proprietà morfologiche e funzionali di emociti di *Mytilus galloprovincialis*, mediante l'utilizzo di parametri e tecnologie innovative per il settore, in grado di quantificare fenomeni biologici in maniera esclusivamente strumentale e standardizzabile. Il ruolo dei parametri indagati quali markers precoci di stress, inoltre, potrebbe suggerire un loro possibile utilizzo anche in studi di campo, come strumenti di monitoraggio del sistema immunitario e delle perturbazioni negative indotte da fattori ambientali o antropici.

**STUDIO DEL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE NEGLI EMOCITI DI MITILI (*MYTILUS GALLOPROVINCIALIS*, LMK 1819)**

Tiscar P.G., Narcisi V., Paradisi A., Mosca F., Marozzi S., Calzetta A., De Sanctis F., Maccarrone M.

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

Gli *endocannabinoidi* costituiscono una classe di mediatori lipidici, riscontrabili dagli invertebrati all'uomo, aventi il ruolo di immuno-neuro-modulatori. Nell'uomo essi esercitano attività anti-ossidativa, ipotensiva, immunosoppressiva, antinfiammatoria e antidolorifica; le molecole più rappresentative di questa classe sono l'Anandamide (*N-arachidoniletanolamina*, AEA) ed il 2-AG (*2-arachidonilglicerolo*). L'AEA deriva dall'idrolisi della *N-arachidonil fosfatidiletanolamina* (NAPE), un fosfolipide presente in tutte le membrane cellulari. Dopo essere stata secreta l'AEA si lega ai recettori cellulari (*Cannabinoid Receptor*), quali in primo luogo CB1 e CB2, rispettivamente espressi dalle cellule del sistema nervoso centrale e dalle cellule del sistema immunitario. Nell'ambito delle azioni che l'AEA svolge nell'uomo, l'attivazione di CB1 e CB2 stimola l'ossido nitrico sintasi (NOS) alla formazione di ossido nitrico (NO) a partire dall'arginina. L'NO reagisce con l'anione superossido per formare perossinitrito, il quale attiva l'*anandamide membrane transporter* (AMT) che permette l'ingresso dell'AEA nella cellula. Relativamente al sistema immunitario dei molluschi lamellibranchi, la fagocitosi rappresenta il principale meccanismo di difesa e viene attivata dagli emociti; in seguito all'evento fagocitario si innesca nella cellula il *burst respiratorio* che ha il compito di generare molecole ad azione tossica quali i radicali liberi dell'ossigeno (ROS). Nei mitili inoltre è stata evidenziata una attività inibente la locomozione emocitaria da parte dell'AEA e del 2-AG attraverso una via NO dipendente. Nel presente lavoro, mediante chemiluminescenza è stata valutata, in presenza o assenza di AEA, la produzione di ROS in seguito alla fagocitosi di lieviti, e tramite un analizzatore di vitalità cellulare (Vi-Cell, Beckman) la capacità locomotoria degli emociti successiva alla fagocitosi batterica. I risultati in chemiluminescenza hanno dimostrato un suo decremento dipendente dalla concentrazione di AEA, mentre l'analisi al Vi-Cell ha evidenziato una diminuzione dell'attività fagocitaria nei termini di aumento della circolarità cellulare in presenza di AEA: la diminuzione dei valori di chemiluminescenza troverebbe così ragione in una diminuzione globale dell'attività fagocitaria degli emociti AEA dipendente. Lo studio della presenza di un sistema funzionale relativo agli endocannabinoidi negli emociti di mitili ha dimostrato inoltre il riconoscimento sierologico di CB2 mediante Western Blotting, la presenza dell'avvenuto legame sulle membrane cellulari di <sup>3</sup>H-CP55.940 (cannabinoidi sintetico marcato), il trasporto intracellulare di AEA marcata e la presenza di un'attività idrolitica capace di produrre etanolamina ed acido arachidonico libero. I saggi effettuati hanno quindi fornito le prime indicazioni circa la possibile presenza di un sistema endocannabinoidi funzionale negli emociti di mitili e circa l'azione biologica di tipo immunodepressivo da parte dell'AEA su queste cellule. Il lavoro condotto apporta ulteriori informazioni sulla conoscenza del sistema immunitario dei mitili che, tra l'altro, rappresentano un modello di studio semplificato, grazie alle più elementari interazioni tra i sistemi organici presenti negli organismi invertebrati. Inoltre l'AEA, nell'uomo, riveste una funzione "anti-stress" collegata alle molteplici azioni che essa svolge, e potrebbe essere dunque ipotizzabile utilizzare in futuro il sistema endocannabinoidi nell'applicazione pratica dello studio dello stress nei molluschi.



## ALTERAZIONI INDOTTE DALL'USO DI PROTEINE VEGETALI IN DIETE PER PESCI

Daprà F.<sup>1</sup>, Gai F.<sup>2</sup>, Prunotto M.<sup>3</sup>, Prearo M.<sup>4</sup>, Palmegiano G.B.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Produzioni Animali, Epidemiologia ed Ecologia, Università di Torino; <sup>2</sup> ISPA - CNR, sezione di Torino; <sup>3</sup> Dipartimento di Morfofisiologia Veterinaria, Università di Torino; Via Leonardo da Vinci, 44 – 10095 Grugliasco (TO); <sup>4</sup> Istituto Zooprofilattico del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Sezione di Torino, Ittiopatologia e Acquacoltura, Via Bologna, 148 – 10154 Torino

Una delle linee più studiate in nutrizione dei pesci è la sostituzione delle farine e gli oli di pesce con altri di origine vegetale. A fronte di risultati fortemente contrastanti a seconda della fonte proteica usata, si è ipotizzato uno stato di sofferenza nel digerente dei pesci così alimentati con una ridotta capacità di assorbimento degli alimenti.

E' stata perciò condotta una prova conoscitiva degli effetti della proteina di lupino, *Lupinus albus*, decorticato e deamarizzato sulla funzionalità digestiva di trota iridea cercando di evidenziare l'eventuale sofferenza a carico dell'apparato digerente mediante verifica dell'attività enzimatica digestiva e del quadro istologico dell'intestino medio, retto e del fegato.

Il piano sperimentale prevedeva l'aggiunta dell'1% di lectine ad una dieta di controllo ed ad una contenente il 53% di lupino con una sostituzione del 50% circa della farina di pesce. Si avevano perciò quattro diete: la prima a base di farina di pesce, la seconda a base di farina di lupino, la terza con farina di pesce e lecitina, la quarta con farina di lupino e lecitina. Lo schema pertanto era del tipo 2 x 2 con tre repliche.

I risultati hanno mostrato che l'inclusione di lectine al livello dell'1% altera la funzionalità degli enzimi digestivi ed il quadro istologico epatico.

Le proteasi totali, tripsina e chimotripsina hanno complessivamente un'attività più alta nei ciechi pilorici e nell'intestino medio. Le amilasi sono molto attive nei ciechi pilorici e, a seguire con valori decrescenti, nell'intestino medio, nel retto e nello stomaco. Per i vari trattamenti con o senza lectine, differenze delle proteasi totali appaiono nello stomaco con attività più alte ottenute con la dieta di controllo e la dieta Lupino rispetto alle altre due con presenza di lectine.

I risultati istologici indicano delle lievi alterazioni a carico del fegato dovute alle lectine quali glicogenosi, lipidosi e congestione vascolare. Nei tratti post gastrici, ciechi pilorici ed intestino medio, vi sono alterazioni a carico degli enterociti ed infiltrazioni linfocitarie nella lamina propria e nella mucosa. Il maggior numero di alterazioni si rileva nei campioni di pesci alimentati con le diete integrate con le lectine, in particolare la dieta a base di farina di pesce e lectine. Nei tratti distali dell'apparato digerente le alterazioni della mucosa sono minime, tuttavia appaiono più evidenti le infiltrazioni linfocitarie nei soggetti alimentati con la dieta a base di farina di pesce e lectine.

In conclusione le lectine interferiscono con la fisiologia della digestione ed in particolare nei ciechi pilorici si manifestano delle alterazioni che sono correlate con il quadro istologico.

## LA NEFROCALCINOSI NELLA SPIGOLA, *DICENTRARCHUS LABRAX*, (LINNEO, 1758) ALLEVATA IN CONDIZIONI INTENSIVE. DESCRIZIONE DI UN CASO

Beraldo P.<sup>3</sup>, Bossù T.<sup>1</sup>, Di Nocera F.<sup>1</sup>, Galeotti M.<sup>3</sup>, Gennari L.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e Toscana - Roma; <sup>2</sup> Libero Professionista; <sup>3</sup> Università degli Studi di Udine, Facoltà di Medicina Veterinaria, Dipartimento di Scienze della Produzione Animale, Via delle Scienze, 206 – 33100 Udine

Il lavoro descrive un episodio di nefrocalcinosi registrato in spigole allevate in intensivo. L'analisi del caso comprende l'intera storia del lotto, dalla semina alla pesca, inclusi i vari trasferimenti parziali dalla vasca principale alle vasche di destinazione anche se gli effetti della patologia si sono manifestati solo a fine ciclo produttivo. Le spigole sono state fornite da un'avannotteria commerciale, ottenute mediante riproduzione artificiale ed allevate con la tecnica delle acque chiare. I pesci, provenienti da 2 diversi lotti, sono stati seminati ad un mese di distanza in un impianto a terra in vasche in cemento ed allevati in condizioni intensive. I 2 lotti non erano confrontabili dal punto di vista dell'origine genetica e del ciclo produttivo, anche se la standardizzazione dei metodi di produzione in avannotteria non comporta differenze di rilievo per quanto riguarda le potenzialità zootecniche in fase di successivo pre-ingrasso ed ingrasso dei pesci prodotti. Alla luce dei risultati ottenuti e degli eventi di mortalità registrati nel corso dell'intero ciclo produttivo, i 2 lotti e le relative vasche di destinazione, sono stati classificati come gruppo nefrocalcinosi e gruppo di controllo. Le metodiche di controllo impiegate sono state: analisi dell'acqua; indagine clinica, anatomopatologica, istopatologica ed analisi dei parametri zootecnici di valutazione del risultato (resa finale, analisi delle mortalità, produttività, indice di conversione, accrescimenti). Considerato l'impatto delle densità sulla qualità dell'acqua con particolare riferimento al pH ed alla concentrazione di CO<sub>2</sub>, si è cercato, nel confronto delle situazioni di carico dei 2 lotti, di individuare differenze che potessero spiegare la comparsa dei sintomi e della mortalità nel gruppo nefrocalcinosi rispetto al gruppo di controllo a conferma di quanto riportato in letteratura per giovanili di bavosa lupa (*Anarhichas minor* Olafsen) (Foss *et al.*, 2003), per trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*) (Eddy *et al.*, 1979; Smart *et al.*, 1979; Smart, 1981), per giovanili di salmone atlantico (*Salmo salar*) (Fivelstad *et al.*, 1999). La differenza di carico creatasi nel corso del primo anno è riconducibile ad un maggior potenziale di crescita nel gruppo nefrocalcinosi rispetto al gruppo di controllo. Questa stessa differenza ha determinato condizioni favorevoli all'insorgere della nefrocalcinosi. Dal momento che tutte le vasche del gruppo nefrocalcinosi, seppur in misura variabile, hanno presentato sintomi e mortalità non riscontrati nel gruppo di controllo, è apparso lecito collegare il fenomeno alla diversa situazione riscontrata nel primo anno. L'ipotesi di un effetto cumulativo è stata confermata dal fatto che, nel corso dell'estate del secondo anno di allevamento, 2 vasche del gruppo nefrocalcinosi hanno subito un secondo picco di carico tale da determinare un ulteriore peggioramento rispetto ad altre vasche, appartenenti allo stesso gruppo. A questo punto l'ipotesi più realistica è risultata essere che la differenza dei carichi estivi del primo anno sia stata sufficiente a determinare un diverso andamento dei sintomi e della mortalità, con patologia conclamata nel gruppo nefrocalcinosi ed assenza di sintomi evidenti nel gruppo di controllo. Negli anni successivi il mantenimento di carichi relativamente bassi durante il primo anno ha consentito di evitare il ripresentarsi della patologia. Seppur poco probabile, rimane l'ipotesi di una predisposizione alla nefrocalcinosi riconducibile ad un eventuale inizio di deposizione di calcio a livello renale negli avannotti utilizzati per la costituzione del gruppo nefrocalcinosi.

**NEFROCALCINOSI IN BRANZINO (*DICENTRARCHUS LABRAX*, LINNAEUS 1758): ASPETTI ANATOMOISTOPATOLOGICI**

Beraldo P., Galeotti M.

*Università degli Studi di Udine, Facoltà di Medicina Veterinaria, Dipartimento di Scienze della Produzione Animale, Via delle Scienze, 206 – 33100 Udine*

La nefrocalcinosi è un'alterazione renale caratterizzata dalla formazione di depositi calcarei nei tubuli renali, costituiti da precipitati insolubili, contenenti principalmente calcio, fosforo, magnesio e cloro. E' un processo patologico di tipo degenerativo, ad andamento cronico che generalmente non causa elevati tassi di mortalità nei pesci, o addirittura passa inosservato. L'eziologia di questa alterazione renale, descritta inizialmente in trote allevate e inserita fra le malattie di origine alimentare, sebbene non ancora perfettamente chiarita, sembra sia da ricondurre a modificazioni dei parametri chimico-fisici dell'acqua (soprattutto elevate concentrazioni di CO<sub>2</sub>) e a fattori dietetici. La nefrocalcinosi è stata frequentemente descritta nei pesci di acqua dolce e in particolare nei Salmonidi, mentre sporadiche sono state le segnalazioni in specie marine allevate. L'intento quindi di questo lavoro è di fornire una descrizione anatomopatologica e istologica dei quadri lesivi causati da eccessivo deposito di precipitati cristallini negli epiteli, nell'interstizio e nei lumi tubulari del rene di branzino. A tal fine sono stati utilizzati 2000 avannotti di branzino, aventi un peso medio iniziale pari a 2.4g, estrapolati da una popolazione normale, ottenuta tramite riproduzione artificiale controllata e allevata seguendo i normali protocolli in uso nell'impianto ospitante. Tali animali sono stati allevati in vasche di vetroresina quadrangolari (500ind/vasca) della capacità di 1m<sup>3</sup>, rifornite da acqua di pozzo con salinità pari a 37‰, temperatura 19-19,5° C e pH 7,4. Il protocollo sperimentale ha previsto 11 campioni, effettuati nell'arco di quasi due anni: 8 campioni con cadenza mensile, mentre 3 campioni sono stati eseguiti distanziati tra loro di qualche mese. Ogni campione era costituito da 10-20 soggetti per vasca, i quali dopo l'esame anatomopatologico sono stati fissati in Bouin (+4° C) o formalina tamponata al 4% e, quindi processati seguendo un protocollo istologico standard. La valutazione istologica è stata eseguita osservando al microscopio ottico (Leica DMLB) preparati colorati con Ematossilina-Eosina, Alizarina S e tricromica di Masson. Tale esame (effettuato in totale su 250 soggetti) è stato svolto considerando differenti parametri, relativi alla morfologia del parenchima renale e alla presenza di precipitati di sostanza minerale (SM), tramite un sistema di graduazione istologica (*grading*) che utilizza valori numerici per esprimere il grado di alterazione patologica o per caratterizzare un evento. La valutazione istologica ha messo in luce che alle specifiche caratteristiche dell'acqua, abbinate alla tipologia di allevamento e alle tecniche di alimentazione adottate, è associata una prevalenza della malattia pari al 100%. Numerose sono le lesioni istopatologiche ravvisate, in particolare i depositi di SM di grande dimensione, presenti a livello di ureteri e tubuli collettori, hanno causato un'azione ostruttiva e compressiva alla quale generalmente è associato un quadro istolesivo simile alla idronefrosi. La persistenza dell'azione esercitata dai depositi di SM ha generato aree più o meno estese di atrofia sclerotica del parenchima renale, caratterizzate da fibrosi interstiziale e dalla presenza di infiltrato cellulare. Il quadro istolesivo medio riscontrato appare sufficiente per provocare tassi di mortalità seppur lievi, ed è ipotizzabile che possa generare uno stress cronico (causato da ipofunzionalità renale) e quindi influenzare negativamente le prestazioni produttive e ridurre le difese immunitarie del pesce.

## RISULTATI PRELIMINARI SUGLI INDICI BIOCHIMICI DI STRESS IN ESEMPLARI DI TROTA IRIDEA (*ONCORHYNCHUS MYKISS*) D'ALLEVAMENTO

Elia A.C., Anastasi V., Brunetti R.\*, Gustinelli A.\*\*, Fioravanti M.L.\*\*, Taticchi M.I., Prearo M.\*

*Dipartimento di Biologia Animale ed Ecologia, Via Elce di Sotto, 8 – 06100 Perugia;*  
 \* *Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Via Bologna, 148 – 10154 Torino;* \*\* *Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale, Via Tolara di Sopra, 50 -40064 Ozzano Emilia (BO)*

I pesci, negli allevamenti ittici, possono essere continuamente soggetti a fattori di stress sia abiotici che biotici. Infatti, le fluttuazioni ambientali, le pratiche di allevamento, il trasporto, i trattamenti medicati e la scarsa qualità dell'acqua, possono causare considerevoli stress, alterando i meccanismi omeostatici dei pesci, rendendoli pertanto suscettibili ad una grande varietà di patogeni e inquinanti ambientali. Le patologie ittiche sono, pertanto, uno dei problemi più rilevanti negli impianti di acquacoltura in quanto causano un aumento dei costi. L'utilizzo di alcuni indici biochimici di stress, noti anche con il termine di biomarkers, può fornire indicazioni sul "livello di salute" di una popolazione ed il suo passaggio dallo stato di "omeostasi" a quello di "malattia".

Molti fattori proossidanti possono causare un'alterazione della difesa antiossidante con conseguente variazione dei livelli degli indici biochimici detossificanti come la glutazione S-transferasi (GST), la gliossalasi I (GI), la glutazione perossidasi (Se-GPx) e la glutazione reduttasi (GR).

La valutazione dello "stato di salute" di trota iridea d'allevamento è stata condotta mediante l'applicazione degli indici sopradetti, come potenziali biomarkers di stress ossidativo in alcuni tessuti bersaglio. Gli esemplari di trote (femmine del peso di circa 350 g) sono stati campionati mensilmente, da aprile ad agosto 2004, in tre impianti di troteicoltura del nord Italia, situati uno in montagna e due in pianura. Quello di montagna è stato scelto come allevamento di controllo, in quanto indenne da patologie ittiche. Il fegato e i reni sono stati prelevati *in situ*, mentre in laboratorio sono state realizzate le analisi biochimiche, condotte con metodi spettrofotometrici.

Dai risultati preliminari si evidenzia una risposta antiossidante differente nei vari mesi di campionamento e tra i tre allevamenti, in entrambi i tessuti di trota analizzati. Da aprile ad agosto, si registrano variazioni minori dei livelli degli indici biochimici nelle trote dell'allevamento di montagna rispetto a quelli di pianura. Inoltre, nei mesi estivi si osserva una marcata induzione degli stessi indici in entrambi i tessuti degli esemplari di pianura.

In questi ultimi l'attività enzimatica della GST, nel fegato (circa 300 nmol/min/mg prot) e nel rene (circa 150 nmol/min/mg prot), è due volte più alta rispetto a quella degli esemplari di montagna. Similmente al primo enzima, nel rene, anche la Se-GPx (circa 160 nmol/min/mg prot) e la GR (circa 112 nmol/min/mg prot), mostrano valori decisamente più alti (3- 4 volte) nelle trote degli impianti di pianura, rispetto a quelle dell'altro impianto.

In conclusione, nelle trote degli allevamenti di pianura si rileva un più alto grado di stress ossidativo, rispetto a quelle dell'impianto sito in montagna, soprattutto nei mesi estivi. La valutazione dell'alterazione dello stato di salute di questi organismi rende possibile degli interventi risanatori tempestivi, prima che il danno possa diventare irreversibile, allorché siano chiari i fattori proossidanti.

## SCREENING BIOCHIMICO NELL'EPATOPANCREAS DI DUE SPECIE ITTICHE AUTOCTONE DEL FIUME TEVERE PER L'INDIVIDUAZIONE DI BIOMARKERS DI STRESS AMBIENTALE

Elia A.C., Dörr A. J. M., Fanetti A., Prearo M.\*, Taticchi M.I.

*Dipartimento di Biologia Animale ed Ecologia, Via Elce di Sotto, 8 – 06100 Perugia;*

*\* Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Via Bologna, 148 – 10154 Torino*

Gli obiettivi di questa ricerca consistono nel determinare lo stato di conservazione del fiume Tevere (tratto umbro) per mezzo dell'utilizzo di bioindicatori e biomarkers di stress ossidativo e nel mettere a punto metodi di monitoraggio in grado di fornire informazioni più puntuali ed esaustive sulla qualità dell'ambiente e sullo stato di salute degli organismi che in esso vivono. La valutazione di alcuni indici biochimici come biomarkers di stress ossidativo (glutazione S-transferasi -GST, glutazione perossidasi -SeGPx, glutazione riduttasi - GR, gliossalasi - GI e glutazione totale) è stata condotta negli epatopancreas di due specie ittiche autoctone del Tevere, quali il barbo (*Barbus tyberinus*) e il cavedano (*Leuciscus cephalus*).

Il monitoraggio del fiume Tevere è stato condotto nel tratto che scorre nel territorio della Provincia di Perugia ed è stato effettuato in giugno-luglio (Fase I) e settembre 2003 (Fase II). Sono state scelte le seguenti stazioni di campionamento: San Giustino (TEVE01), Umbertide (TEVE02), Ponte Nuovo (TEVE03) e il torrente Sovara (SOVA01). Quest'ultimo è stato scelto come corso d'acqua di controllo, poiché scorre in un bacino scarsamente antropizzato.

Il campione ittico è stato catturato mediante l'elettropesca e, per ognuna delle 2 specie, sono stati selezionati 10 esemplari. *In situ*, è stato registrato peso e lunghezza di ogni singolo individuo e prelevato l'epatopancreas. I tessuti epatici sono stati processati singolarmente e le analisi biochimiche sono state eseguite con metodi spettrofotometrici.

Dai risultati conseguiti si evidenzia che la Se-GPx è notevolmente più alta (circa 3 e 6 volte per il cavedano e per il barbo, rispettivamente) in TEVE01 (fase I), rispetto a quella delle stazioni a valle; in fase II i valori dell'enzima aumentano in tutti gli esemplari, specialmente in quelli dei settori più a valle. Il livello di glutazione nel barbo di TEVE01 (fase I) è 3-4 volte più alto rispetto a quello di TEVE02 e TEVE03 ed aumenta considerevolmente in tutti gli esemplari della seconda fase. Ambedue le specie ittiche mostrano andamenti della GST simili e con valori più alti in TEVE01 (250 e 450 nmol/min/mg prot per il barbo e cavedano, rispettivamente), rispetto a quelli delle stazioni a valle (100 e 150 nmol/min/mg prot per il barbo e cavedano, rispettivamente). Similmente alla GST, anche le gliossalasi e la GR, in entrambe le specie ittiche, mostrano delle variazioni che sono più marcate tra le stazioni, che tra le fasi. In generale, i valori degli indici biochimici misurati nel cavedano di SOVA01 sono simili a quelli delle stazioni a valle del tratto fluviale considerato.

La valutazione dei biomarkers di stress ossidativo nelle due specie ittiche ha messo in evidenza che gli esemplari delle stazioni a valle, specialmente in fase I, sono soggetti ad un maggiore grado di stress ossidativo rispetto a quelli della stazione a monte. Tra le due specie, il barbo è quella più sensibile, in grado di indicare, tramite la notevole variazione dei livelli dei biomarkers, la differente qualità ambientale delle stazioni lungo l'asta fluviale del Tevere.

I risultati di questa indagine basati sulla risposta adattativa dei singoli individui alle condizioni ambientali dei settori di fiume considerati, indicano che le due specie sono esposte a fattori tossici che potrebbero provocare l'insorgenza di effetti nocivi particolarmente nelle due stazioni più a valle. Questi settori di fiume dovranno essere costantemente monitorati per poter intervenire precocemente e prevenire ogni possibile effetto nocivo sulle comunità ittiche.

## VALUTAZIONE DELLA BIODISPONIBILITÀ DI OSSITETRACICLINA MICROINCAPSULATA A SEGUITO DI SOMMINISTRAZIONE ORALE SINGOLA E PROTRATTA NELLA TROTA (*SALMO TRUTTA TRUTTA*) E NEL BRANZINO (*DICENTRARCHUS LABRAX*)

Della Rocca G., Di Salvo A., Malvisi J.

*Dipartimento di Tecnologie e Biotecnologie delle Produzioni Animali, Sezione di Farmacologia e Tossicologia Veterinaria, Università di Perugia. Via S. Costanzo 4, 06126 Perugia.*

**Scopo della ricerca.** Nell'ottica di migliorare nelle specie ittiche l'assorbimento orale dell'ossitetraciclina (OTC), e nell'ambito di una ricerca in corso durante la quale sono già stati saggiati vari tipi di microincapsulazione del farmaco, una nuova formulazione a base di OTC incapsulata in polisaccaridi naturali (OTC test) è stata saggiata nella trota (*Salmo trutta trutta*) e nel branzino (*Dicentrarchus labrax*) sia a seguito di somministrazione singola che di trattamento protratto per 5 giorni, in comparazione alla formulazione a base di OTC presente in commercio (OTC di riferimento).

**Materiali e metodi.** Mangime medicato contenente 4,44 e 7,33 mg/kg di OTC rispettivamente per la formulazione test e per quella di riferimento è stato somministrato a 260 trote e altrettanti branzini in ragione dell'1% della biomassa.

Campioni di sangue sono stati prelevati da 10 soggetti/scadenza sperimentale (1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 36, 48, 60, 84, e 108 ore dopo somministrazione singola e 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108, 120, 132, 144 e 156 ore a partire dal primo trattamento della somministrazione protratta). I sieri sono stati stoccati a -20° C fino al momento dell'analisi quantitativa, eseguita con metodica HPLC dopo purificazione SPE.

Il limite di quantificazione della metodica utilizzata è risultato pari a 0,05 µg/ml sia per il siero di trota che di branzino.

**Risultati.** Nella trota i valori di AUC della formulazione test sono risultati più bassi rispetto a quelli della formulazione di riferimento sia dopo somministrazione singola che protratta (11,84 e 75,28 µg/ml/h contro 13,40 e 79,50 µg/ml/h); la medesima cosa si è ottenuta per il branzino dove la formulazione di riferimento ha mostrato valori di AUC maggiori: 34,11 e 57,53 µg/ml/h contro 25,95 e 34,11 µg/ml/h. Tenendo conto che la formulazione test presentava un titolo inferiore in OTC rispetto a quella di riferimento, il calcolo delle biodisponibilità relative nelle due prove è risultato rispettivamente pari a 146 e 156% nella trota e a 126 e 122% nel branzino.

**Conclusioni.** In un nostro precedente studio<sup>1</sup> erano state saggiate diverse matrici per la microincapsulazione dell'OTC (acidi grassi saturi e insaturi, polimeri dell'amido, della pectina e dell'alginato) senza ottenere successo; i risultati ottenuti con questo nuovo carrier evidenziano invece un notevole miglioramento nell'assorbimento orale di OTC nel pesce.

## TENORI DI SELENIO E ZINCO IN PESCI D'ALLEVAMENTO E DI CATTURA

Abete M.C., Palmegiano P., Brunetti R., Pavino D., Arsieni P., Andruetto S., Prearo M.

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Via Bologna, 148 – 10154 Torino*

Il selenio e lo zinco sono degli oligoelementi essenziali nell'alimentazione dei pesci. Il selenio presenta numerosi ruoli biochimici: è parte integrante dell'enzima glutatione perossidasi selenio-dipendente, che ha una funzione protettiva nei confronti delle cellule e delle membrane cellulari dallo stress ossidativo; inoltre presenta un'azione protettiva nei confronti della tossicità di alcuni metalli pesanti, quali cadmio e mercurio. Tale metallo, oltre ad essere considerato come un elemento essenziale per la crescita e lo sviluppo degli organismi, presenta una tossicità che varia a seconda della specie animale. Nei pesci entrambi le funzioni sono poco studiate: le carenze sono state segnalate ad esempio in trota iridea, carpa e pescegatto, con diminuzione della crescita, mentre in associazione a carenze di vitamina E (tocoferoli), si ha l'insorgenza di distrofie muscolari in salmoni e diatesi essudative in trote. Gli effetti tossici invece determinano una minor efficienza della dieta, con crescita ridotta ed alta mortalità. Inoltre si verificano deformazioni embrionali, a livello della colonna vertebrale (scoliosi) e delle ossa mascellari e mandibolari. Lo zinco è catalizzatore in diverse reazioni biochimiche, entrando nella composizione di numerosi metallo-enzimi; gioca un ruolo importante nei processi metabolici dei carboidrati, dei protidi e dei lipidi. La sua carenza determina fenomeni di diminuzione della crescita, con forme di nanismo, erosioni cutanee e delle pinne ed una forma di cataratta bilaterale evidenziata in trote iridea. In alcune specie ittiche, come il pescegatto, la sua carenza può determinare una diminuzione di produzione di uova ed una loro scarsa adesività. E' stato evidenziato come alti livelli di zinco siano ben tollerati da alcune specie ittiche come trota iridea e carpa. Scopo di tale lavoro è quello di verificare i livelli di tali metalli in diverse specie ittiche sia d'allevamento che delle acque libere dulciacquicole e marine.

Sono stati analizzati 84 campioni di pesci, suddivisi in 44 specie d'allevamento (34 dulciacquicole e 10 marine) e 40 specie di pesca (20 dulciacquicole e 20 marine). Le porzioni muscolari dei campioni sono state omogeneizzate e successivamente mineralizzate in forno a microonde, con miscela acido nitrico e perossido d'idrogeno. La determinazione del selenio è stata condotta mediante spettrofotometria di assorbimento atomico con atomizzazione elettrotermica (Z-ETA-AAS), mentre per lo zinco la lettura è stata eseguita in fiamma (F-AAS). Il limite di quantificazione del selenio è pari a 0,50 ppm, mentre quello dello zinco è di 0,06 ppm.

Per il selenio sono stati riscontrati livelli di 0,64 ppm nei pesci d'allevamento e 0,62 ppm in quelli di cattura. Lo zinco invece si attesta su valori di 20,68 ppm nei campioni d'acquacoltura e 10,74 ppm in quelli provenienti dalla pesca.

Ad oggi i fabbisogni di selenio e zinco nei pesci allevati sono conosciuti solo per alcune specie. Tenuto conto che questi metalli sono introdotti quasi esclusivamente attraverso la dieta, i tenori riscontrati nella porzione muscolare indicano che non vi è stata alcuna contaminazione esterna. I livelli di selenio accertati garantiscono i fabbisogni nutrizionali e nel contempo non risultano essere pericolosi per la salute del pesce.

Questo studio è un primo monitoraggio sulle concentrazioni di tali elementi nella fauna ittica e rappresenta la parte iniziale di una ricerca volta allo studio del passaggio di tali metalli dal mangime al prodotto ittico.

## PRESENZA DI METALLI PESANTI IN TINCHE (*TINCA TINCA*) DEL LAGO TRASIMENO

Prearo M., Palmegiano P., Gavinelli S., Elia C.\*, Campo Dall'Orto B., Tarasco R., Piccin E., Abete M.C.

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Via Bologna, 148 - 10154 Torino; \* Università degli Studi di Perugia, Facoltà di Scienze Matematiche, Fisiche e Biologiche, Dipartimento di Ecologia, Via dell'Elce - 06100 Perugia*

Il lago Trasimeno si trova a nord-ovest dell'Umbria, al confine con la Toscana ed è per estensione il quarto lago nazionale, il più esteso dell'Italia peninsulare. Presenta una forma grossolanamente circolare; è considerato un lago chiuso, privo cioè di un emissario naturale ed è alimentato da piccoli torrenti che raccolgono l'acqua piovana. Pertanto il suo regime idrologico ha delle forti oscillazioni stagionali legate all'andamento delle piogge.

Il lago Trasimeno risulta tuttora un lago pescoso: nelle sue acque vivono una svariata e pregiata fauna ittica, di cui la tinca (*Tinca tinca*) è la specie maggiormente apprezzata per la pesca, sia professionale sia sportiva. Il perdurare di stagioni siccitose degli ultimi anni, ha aggravato notevolmente la crisi idrica di tale bacino, con abbassamento del livello del lago e conseguenti fenomeni di impaludamento. Lo scopo del presente lavoro è valutare la presenza di metalli pesanti in una specie ittica pregiata oggetto di pesca, per monitorare, allo stato attuale, il grado di contaminazione di questi elementi.

Nel corso del 2003 sono stati effettuati 84 campionamenti di tinche; sono stati monitorati 3 siti, corrispondenti a San Feliciano, Sant'Arcangelo e Porto di Panicarola, stazioni posizionate nella porzione meridionale del lago. In ogni località sono stati prelevati 28 esemplari suddivisi in 4 campionamenti successivi (gennaio, aprile, giugno e novembre). I metalli oggetto d'indagine sono stati arsenico, cadmio, cromo, mercurio, rame e piombo, tutti ricercati nella parte edibile dei pesci. La determinazione analitica è stata condotta mediante spettrofotometria di assorbimento atomico, con atomizzazione elettrotermica per arsenico, cadmio, cromo e piombo, con atomizzazione in fiamma per il rame e tecnica dei vapori freddi per il mercurio. I risultati sono stati elaborati statisticamente utilizzando un programma computerizzato (SPSS 11.0) che ha permesso di effettuare l'analisi della varianza (ANOVA), il test F di Fisher, il test di Levene ed il test di Brown-Forsythe.

Le concentrazioni medie rivenute sono per l'arsenico 11,9 ppb (ng/g), per il cromo 38,9 ppb e per il piombo 24,9 ppb. Per il cadmio ed il mercurio tutti i campioni sono risultati inferiori al limite di quantificazione del metodo (rispettivamente 10 ppb e 70 ppb), mentre per il rame si è riscontrato un solo esemplare sugli 84 esaminati, con un contenuto di 800 ppb. Dall'analisi della varianza e dagli altri test (livello di significatività fissato al 5%), si evince che le medie di arsenico riferite alle stazioni di pesca, non risultano essere significativamente diverse; stesso discorso risulta essere valido per cromo e piombo.

I risultati ottenuti mostrano che in nessun caso si sono superati i limiti massimi residuali previsti dalla normativa vigente. Inoltre i dati presentano una loro significatività statistica, che ha permesso di evidenziare nei tre siti di prelievo una medesima situazione. Tuttavia per un più completo monitoraggio delle condizioni del lago nei confronti di questi inquinanti, si dovrebbe prevedere un maggior numero di punti di prelievo ed una maggiore varietà campionaria.

I bassi livelli riscontrati nelle tinche, prodotto tipico della pesca nel lago Trasimeno, indicano che il rischio sanitario attuale è molto basso; inoltre, le concentrazioni misurate non possono causare fenomeni di intossicazione cronica che inducono patologie dannose nel pesce.



## RESIDUI DI POLICLOROBIFENILI (PCB) NEI PRODOTTI ITTICI D'ACQUACOLTURA

Vivaldi B.\*, Prearo M., Ribechini L.\*, Masiello L.\*, Savio V.\*, Ferrari A.\*, Abete M.C.

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Via Bologna, 148 – 10154 Torino; \* Area Territoriale Liguria, Sezione di Genova, Piazza Borgo Pila, 39/24 – 16100 Genova*

I Policlorobifenili (PCB) sono una classe di idrocarburi non presenti in natura, ma commercialmente prodotti dalla clorazione diretta del bifenile. Dal punto di vista fisico sono caratterizzati da un'elevata stabilità, in funzione del grado di clorazione. La totale distruzione di tali composti è possibile soltanto attraverso processi di incenerimento; l'unico processo naturale di degradazione chimica ambientale è quello di fotolisi, più attivo sui composti a basso grado di clorazione rispetto a quelli a più alto grado. Tali caratteristiche ne determinano la tendenza all'accumulo nell'ambiente e successivamente nella catena alimentare con il fenomeno di bioaccumulo. La dose giornaliera ammessa dall'OMS è di 30-60 microgrammi; una maggiore assunzione può invece indurre dermatiti, danni epatici ed oculari, così come uno stato di immunodepressione. Negli animali, esposizioni croniche possono determinare conseguenze negative sulla sfera riproduttiva, effetti teratogeni e mutageni.

La presente indagine è volta alla valutazione dell'entità della contaminazione e della sua distribuzione nei prodotti d'acquacoltura marina e dulciacquicola.

Dal luglio 2003 al giugno 2004 sono stati esaminati 67 campioni, costituiti ciascuno da un pool di esemplari compreso tra 3 e 5. I prelievi, eseguiti dalle ASL competenti per territorio, sono stati effettuati presso punti vendita, campionando prodotto nazionale ed estero. Le specie prelevate sono state trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*) con 32 campioni, orate (*Sparus aurata*) con 25 campioni e branzino (*Dicentrarchus labrax*) con 10 campioni.

Ogni pool di pesce esaminato è stato macinato, liofilizzato e su un'aliquota di esso si è effettuata la determinazione della percentuale di grasso necessaria per la quantificazione dei PCB su base lipidica. Si è proceduto con l'estrazione trasferendo 1 grammo di liofilizzato direttamente in estrattore a CO<sub>2</sub>. La determinazione qualitativa e quantitativa dei 18 congeneri dei PCB normalmente ricercati e previsti dal Piano Nazionale Residui (PNR), è stata effettuata mediante gascromatografia-spettrometria di massa (GC/MS).

I valori medi ottenuti dalle analisi sono stati 322 ppb (ng/g) per trote iridea, 376 ppb per orate e 445 ppb per branzini. Il livello totale di PCB rilevato nelle specie ittiche esaminate, presenta valori medi tutti superiori ai 100 ppb, limite di congruità alimentare per diversi alimenti (indicato sul PNR), ma non applicabile ai prodotti ittici pescati e d'acquacoltura. Comunque tali tenori riscontrati sono in linea con le concentrazioni medie rinvenute a livello europeo in prodotti analoghi e quindi indicano un comune grado di contaminazione. D'altro canto, la bibliografia riporta come il prodotto di acquacoltura risulterebbe meno contaminato rispetto al prodotto ittico di cattura.

Le quantità rinvenute nel prodotto d'allevamento possono essere attribuite più che all'inquinamento ambientale, proprio del pescato, all'impiego di mangimi contaminati per la possibile presenza di farine di natura ittica inquinate e per contaminazioni involontarie dovute ai processi di produzione.

E' da tenere presente che comunque la presenza di PCB nell'ambiente o nell'alimento può incidere in modo negativo sulla salute dei pesci, con conseguenze sulla comparsa di patologie di natura secondaria.

## LIVELLI DI CADMIO E CROMO IN MITILI (*MYTULUS GALLOPROVINCIALIS*) DEL GOLFO DI LA SPEZIA

Abete M.C., Vivaldi B.\*, Poma Genin E., Ercolini C.\*\*, Bertolotto P.\*, Tarasco R., Prearo M.

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino; \*Area Territoriale Liguria, Sezione di Genova; \*\*Area Territoriale Liguria, Sezione di La Spezia,*

I molluschi bivalvi sono considerati come ideali indicatori ambientali, in quanto tollerano intervalli piuttosto ampi di variazioni delle condizioni dell'ambiente e sono dei concentratori naturali di contaminanti chimici, tra i quali anche i metalli pesanti. Il metabolismo dei metalli pesanti nei molluschi segue una cinetica di diffusione passiva con assorbimento da parte del muco e delle membrane e successiva diffusione verso i componenti intracellulari; i metalli presenti nei sedimenti ed ingeriti dai mitili, possono raggiungere l'intestino. Esiste anche la possibilità di un loro passaggio diretto attraverso le branchie. Nel golfo di La Spezia è storicamente presente l'allevamento dei mitili, che viene effettuato su aree marine con concessione demaniale; l'allevamento nei siti di Portovenere e Isola Palmaria è su pali, mentre è flottante a ridosso della diga foranea. La produzione spezzina di mitili è stimata essere intorno ai 33.000 q/anno, coinvolgendo 67 aziende a conduzione familiare. Il golfo di La Spezia, per la sua conformazione orografica e la presenza della diga foranea che limita lo scambio idrico, è assimilabile ad un grosso lago salato, ciò crea una maggiore concentrazione di inquinanti a causa del relativo stazionamento delle acque; inoltre nel golfo, oltre alle attività portuali (cantieri navali e darsena), sfociano numerosi torrenti e condutture artificiali veicolanti scarichi industriali e domestici. L'obiettivo di tale indagine è quello di valutare i livelli di cadmio e cromo presenti nei molluschi allevati in tale sito, onde stabilire il grado attuale di inquinazione. Nel periodo compreso tra giugno 2003 e settembre 2004, sono stati esaminati 35 campioni di mitili prelevati in 4 stazioni site nel golfo, 3 interne alla diga ed una esterna, localizzata tra il promontorio di Portovenere e l'isola di Palmaria. I mitili sono stati analizzati in pool di 30-40 individui per campione, previa loro omogeneizzazione. L'analisi di cadmio e cromo è stata condotta mediante spettrofotometria di assorbimento atomico, con atomizzazione elettrotermica e correzione del fondo mediante effetto Zeeman. I limiti di quantificazione del metodo d'analisi sono 10 µg/Kg per cadmio e 50 µg/Kg per cromo.

Per cadmio, le concentrazioni medie riscontrate sono state di 0,07 mg/Kg (SD=0,05) nei campioni provenienti da allevamenti siti all'interno della diga foranea e di 0,08 mg/Kg (SD=0,07) in quelli fuori diga. La massima concentrazione rinvenuta è stata di 0,25 mg/Kg in un campione prelevato fuori diga. Invece per il cromo, le concentrazioni medie sono risultate essere di 0,35 mg/Kg (SD=0,52) e di 0,23 mg/Kg (SD=0,21), rispettivamente nei campioni all'interno e all'esterno della diga foranea, con un livello massimo di 1,99 mg/Kg in un lotto di mitili proveniente dall'interno diga. Il Regolamento 466/2001/CE stabilisce per il cadmio un limite massimo consentito nei molluschi bivalvi di 1,0 mg/Kg; tutti i campioni analizzati sono risultati ben al di sotto di questa soglia, confermando l'andamento già monitorato in lavori precedenti. Per quanto riguarda i valori di cromo nei molluschi, la legislazione attuale non impone limiti massimi di residuo; i valori riscontrati non risultano pertanto allarmanti sotto il profilo tossicologico e del benessere animale. Tale studio, oltre a ribadire l'importanza e la versatilità dei molluschi bivalvi quali sensibili bioindicatori nei programmi di monitoraggio ambientale, rappresenta una ulteriore indagine sul livello di contaminazione da metalli tossici nell'ecosistema acquatico del Mar Ligure.

## **RISULTATI PRELIMINARI SUI LIVELLI E PROFILI DI CONTAMINAZIONE DA POLICLOROBIFENILI (PCB) IN MOLLUSCHI EDULI LAMELLIBRANCHI DEL MEDIO ADRIATICO**

Piersanti A., Galarini R., Pecorelli I., Fioroni L., Tavoloni T., Orletti R., Bacchiocchi I., Ghittino C.

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Centro di Referenza Nazionale per il Controllo Microbiologico e Chimico dei Molluschi Bivalvi Vivi (CEREM) – Ancona*

I policlorobifenili (PCB) sono contaminanti organici persistenti (POPs) altamente lipofili, ampiamente distribuiti nell'ambiente e negli alimenti, che rappresentano la principale fonte di esposizione per l'uomo. Sono una famiglia costituita da 209 possibili congeneri, di cui circa 60-70 effettivamente riscontrabili nei sistemi viventi in quantità apprezzabili. La legislazione europea non ha finora emanato limiti massimi di residui (LMR) per i PCB negli alimenti. In particolare, è problematico definire LMR per i prodotti ittici, visti gli elevati livelli di contaminazione naturale. Per la mancanza di valori di riferimento, le concentrazioni in PCB nei molluschi non sono monitorate in modo puntuale dal Servizio Sanitario Nazionale.

Onde valutare i livelli di contaminazione in banchi naturali ed allevamenti della costa marchigiana, ci siamo proposti di mettere a punto e validare un metodo analitico per la determinazione di 18 congeneri di PCB nei mitili. Questi congeneri (T<sub>3</sub>CB-28, T<sub>4</sub>CB-52, P<sub>5</sub>CB-95, P<sub>5</sub>CB-99, P<sub>5</sub>CB-101, P<sub>5</sub>CB-105, P<sub>5</sub>CB-110, P<sub>5</sub>CB-118, E<sub>6</sub>CB-138, E<sub>6</sub>CB-146, E<sub>6</sub>CB-149, E<sub>6</sub>CB-151, E<sub>6</sub>CB-153, E<sub>7</sub>CB-170, E<sub>7</sub>CB-177, E<sub>7</sub>CB-180, E<sub>7</sub>CB-183, E<sub>7</sub>CB-187) sono stati scelti per la loro abbondanza relativa. Sono stati selezionati 16 punti di prelievo (di cui 12 banchi naturali e 4 allevamenti) tra quelli individuati dal piano di monitoraggio delle acque per la molluschicoltura (D. Lgs. 530/92). I campionamenti sono stati effettuati con cadenza trimestrale, per verificare un'eventuale variabilità stagionale nei livelli di contaminazione. Dopo apertura delle valve e prelievo del mollusco (fino a raggiungere 100 g di polpa), il campione è stato omogeneizzato e quindi liofilizzato. Dal prodotto essiccato, con una miscela di acetone/esano, è stata estratta la componente lipidica in condizioni di pressione e temperatura controllate. Dopo evaporazione del solvente, il grasso è stato purificato mediante due colonnine cromatografiche in sequenza, la prima con una fase fissa "Extrelut" acidificata con acido solforico concentrato e la seconda a base di silice. Gli analiti sono stati eluiti con esano e successivamente, dopo aver portato a secco in corrente di azoto, l'estratto è stato ripreso con 0.5 mL di isotano ed iniettato in gascromatografo con rivelatore a cattura di elettroni (GC-ECD).

Le analisi dei campioni appartenenti al primo (maggio/giugno 2003) e terzo prelievo (novembre/dicembre 2003) hanno mostrato come, nella maggior parte dei casi, tutti e 18 i congeneri di PCB siano presenti nei mitili, evidenziando un preciso pattern di distribuzione. Analogamente ad altre tipologie di alimenti, E<sub>6</sub>CB-138 ed E<sub>6</sub>CB-153 sono risultati essere i due congeneri più abbondanti, rappresentando circa il 30% della contaminazione complessiva. A seguire sono stati ritrovati E<sub>6</sub>CB-149 e P<sub>5</sub>CB-101, che hanno contribuito per un altro 20%. Il riscontro di P<sub>5</sub>CB-118 e P<sub>5</sub>CB-105 (in misura del 5% e 1% della contaminazione complessiva), riveste un particolare interesse: a differenza degli altri 16 congeneri, infatti, appartengono alla categoria dei policlorobifenili mono-*orto* sostituiti, aventi tossicità paragonabile a quella delle "diossine".