

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN
Epidemiologia e Controllo delle Zoonosi
Ciclo XXIII

Settore Concorsuale di afferenza: 07/H3

Settore Scientifico disciplinare: VET06

**STATO SANITARIO DI SPIGOLE (*DICENTRARCHUS LABRAX*)
ED ORATE (*SPARUS AURATA*) ALLEVATE IN GRECIA E IN
ITALIA IN RELAZIONE ALLA PRESENZA DI AGENTI DI
ZONOSI ED ECTOPARASSITI PATOGENI**

Presentata da: **Angeliki Ioannou Kapota**

Coordinatore Dottorato

Prof. Giovanni Poglayen

Relatore

Prof.ssa Marialetizia Fioravanti

Correlatore

Dr. George Rigos

Esame finale anno 2012

INDICE

INTRODUZIONE.....	PAG. 1
LA MARICOLTURA NEL MEDITERRANEO.....	PAG. 5
PRINCIPALI MALATTIE PARASSITARIE DEI PESCI MARINI D'ALLEVAMENTO.....	PAG. 26
ANISAKIASI.....	PAG. 38
MATERIALI E METODI.....	PAG. 51
RISULTATI E DISCUSSIONE RELATIVI AD ECTOPARASSITI DI SPIGOLA ED ORATA	PAG. 60
RISULTATI E DISCUSSIONE RELATIVI ALLA RICERCA DI LARVE DI <i>ANISAKIS</i> SPP. IN SPIGOLA ED ORATA.....	PAG.131
CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE.....	PAG.141
BIBLIOGRAFIA.....	PAG.147
ALLEGATO 1	
ALLEGATO 2	
ALLEGATO 3	

INTRODUZIONE

La crescente intensificazione della maricoltura mediterranea ha comportato la comparsa di nuove patologie, l'esacerbazione di patologie classiche e l'avvento di vere e proprie tecnopatie, queste ultime sostenute da patogeni opportunisti sottoposti a pressioni di ordine zootecnico. Oltre a determinare stati di sofferenza e mortalità nelle popolazioni ittiche colpite, le patologie rappresentano ormai un fattore limitante la produzione e la commercializzazione del prodotto e una causa primaria di perdite economiche con grave impatto socio-economico.

Le operazioni di profilassi, di controllo e di continuo monitoraggio di tutte le patologie diffuse rappresentano quindi punti essenziali nel processo produttivo, anche in considerazione del fatto che gli interventi terapeutici comportano un forte impatto ambientale, economico e gestionale.

Sebbene le malattie di origine batterica e virale siano sempre state considerate le maggiori responsabili di episodi morbosi in acquacoltura, negli ultimi anni l'attenzione dei ricercatori e degli allevatori si è rivolta anche verso numerose patologie parassitarie, dimostrando che le stesse possono rappresentare veri e propri fattori limitanti in maricoltura, anche alla luce della mancanza di prodotti terapeutici autorizzati.

Per quanto concerne la maricoltura mediterranea, non risulta ancora ben definita l'epidemiologia di numerosi agenti parassitari che possono colpire le specie ittiche marine allevate, né tanto meno i danni da essi provocati nelle diverse realtà d'allevamento. Anche per quanto concerne alcuni ectoparassiti, rappresentati soprattutto da elminti e crostacei, che possono provocare grosse perdite in pesci marini allevati in gabbia galleggiante (Šarušić, 1999), non è stata esaurientemente chiarita la patogenicità nelle diverse specie ittiche e nelle diverse realtà d'allevamento.

In linea generale, anche per quei parassiti considerati comuni nei pesci marini d'allevamento, quali ad esempio *Amyloodinium ocellatum* e *Diplectanum aequans*, gli studi sulla loro importanza sanitaria negli allevamenti marini sono

piuttosto scarsi, soprattutto in riferimento agli ambienti di allevamento “a mare” quali gabbie galleggianti e sommerse. Il crescente utilizzo di queste tipologie d'allevamento potrebbe infatti rappresentare da un lato un elemento predisponente l'avvento di patologie parassitarie sostenute da patogeni fino ad oggi descritti solo in pesci selvatici, quali ad esempio le infestazioni da monogenei Microcotylidae e da crostacei Caligidae e Cimothoidae, e dall'altro un elemento sfavorente l'emergenza di malattie parassitarie sostenute da parassiti legati classicamente agli ambiente d'allevamento “a terra”.

La diversificazione della tipologia d'allevamento e la propensione a diversificare le specie ittiche allevate, caratteristiche queste dell'attuale maricoltura mediterranea, potrebbero quindi rappresentare motivo di diversificazione anche della fauna parassitaria e delle problematiche sanitarie che ne derivano.

Nell'ambito di questa tesi di Dottorato si sono quindi condotte indagini sugli ectoparassiti di spigole ed orate allevate in Italia ed in Grecia, allo scopo di definirne la distribuzione nelle differenti tipologie produttive e nelle diverse categorie di taglia. Al fine di poter valutare il ruolo delle patologie parassitarie sostenute da ectoparassiti nell'ambito dei fattori limitanti le attività produttive in maricoltura e quindi delineare gli opportuni piani di prevenzione, si è deciso di indagare gli effetti patogeni dei parassiti reperiti nelle diverse specie ittiche marine allevate in differenti sistemi d'allevamento (estensivi ed intensivi a terra e “a mare”), mediante la conduzione di studi istopatologici sull'ospite.

Una parte delle attività di ricerca della presente tesi di Dottorato si sono poi focalizzate sulla ricerca di larve di nematodi Anisakidae del genere *Anisakis*, importanti agenti di zoonosi, nelle spigole e nelle orate allevate in gabbia in Italia ed in Grecia.

La crescente importanza dell'Anisakiasi quale zoonosi parassitaria ha infatti indotto l'EFSA ad emettere il documento “Scientific opinion on risk assessment of parasites in fishery products”, dove si raccomanda la conduzione di ricerche volte a migliorare la sorveglianza e l'attenzione diagnostica nei confronti delle reazioni allergiche a parassiti ittici, conducendo parallelamente studi

epidemiologici che possano definire con maggiore esattezza la correlazione tra anisakiasi ittica e patologia nell'uomo.

Per quanto riguarda le specie ittiche d'allevamento, l'EFSA (2010) ritiene ancora insufficienti i dati epidemiologici relativi al "rischio *Anisakis*", che potrebbe sussistere soprattutto in ambienti produttivi in gabbia dove esistono condizioni ambientali e gestionali teoricamente permissive per l'infestazione dei pesci allevati da parte di larve di nematodi Anisakidae zoonosici. Per quanto concerne le specie ittiche marine oggetto d'allevamento in gabbia nel Mediterraneo, ed in particolare spigole ed orate, esistono ancora pochi dati scientifici che attestino l'assenza di larve di *Anisakis* spp., quindi, similmente a quanto già fatto per il salmone atlantico, anche queste specie ittiche andrebbero monitorate attentamente in ambiente d'allevamento in gabbia al fine di produrre dati epidemiologici esaustivi che possano indicare come inequivocabilmente minimo, se non nullo, il "rischio *Anisakis*".

Inoltre va rilevato come anche nei Regolamenti CE che compongono il cosiddetto "Pacchetto Igiene", oltre all'indicazione dei trattamenti di bonifica da effettuare sui prodotti ittici da consumare sotto forma di preparazioni a rischio per ridurre il pericolo di trasmissione, sia evidenziata la possibilità di andare in deroga a tali trattamenti qualora esistano dati epidemiologici a supporto dell'assenza di questi parassiti zoonotici, con rilevanti vantaggi di carattere commerciale ed economico.

La programmazione dell'attività di ricerca è stata articolata in in tre filoni principali:

- 1) studi di prevalenza ed intensità delle più frequenti ectoparassitosi delle spigole e delle orate allevate con diversi sistemi d'allevamento in Italia ed in Grecia;
- 2) valutazione dei danni tessutali correlabili alla presenza degli ectoparassiti reperiti;

-
- 3) ricerche sulla presenza di stadi larvali di nematodi Anisakidae del genere *Anisakis* in spigole ed orate allevate in gabbia in Italia ed in Grecia.

Dopo una prima Parte Generale sull'acquacoltura mediterranea, sui principali ectoparassiti descritti in spigole ed orate d'allevamento e sull'Anisakiasi, vengono presentati i risultati delle ricerche condotte nel corso del triennio di Dottorato, con un capitolo finale di considerazioni conclusive.

LA MARICOLTURA NEL MEDITERRANEO

L'acquacoltura è quella branca della zootecnia che si occupa della produzione di organismi acquatici quali pesci, molluschi, crostacei, ecc. (Giordani e Melotti, 1984). Nell'ultimo decennio, l'acquisizione di conoscenze sulla biologia di numerose specie acquatiche di interesse commerciale, insieme ai progressi scientifici e tecnologici nel campo delle tecniche riproduttive e di allevamento, della mangimistica e dell'ittiopatologia, hanno consentito di incrementare significativamente le produzioni dell'acquacoltura in acque dolci, marine e salmastre.

A livello europeo le specie ittiche principalmente allevate sono il salmone atlantico (*Salmo salar*), la trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*), l'anguilla (*Anguilla anguilla*) la carpa (*Cyprinus carpio*), la spigola (*Dicentrarchus labrax*) e l'orata (*Sparus aurata*).

In Europa è particolarmente sviluppata la maricoltura, che è il settore dell'acquacoltura che si occupa dell'allevamento di organismi di acque marine e/o eurialine (Franchetti, 1983).

Questa attività ha conosciuto negli ultimi anni un notevole successo ed una crescita di tipo esponenziale. In particolare, nel Mediterraneo l'allevamento intensivo di specie ittiche eurialine, quali spigole ed orate, si è sviluppato a partire dagli anni Ottanta grazie alla concomitanza di progressi scientifici nel campo delle tecniche riproduttive, della mangimistica e dell'ittiopatologia. Questo sviluppo ha permesso la produzione di un'importante fonte di cibo proteico di alta qualità.

Pesca ed acquacoltura, secondo i dati FAO più aggiornati (2010), hanno superato una produzione ittica di 145 milioni di tonnellate (Fig. 1). Al consumo umano, oramai arrivato a circa 17 kg pro capite, sono andati 115 milioni delle tonnellate prodotte, mentre la restante parte è stata utilizzata per uso zootecnico o non alimentare.

	2004	2005	2006	2007	2008	2009
(Million tonnes)						
PRODUCTION						
INLAND						
Capture	8.6	9.4	9.8	10.0	10.2	10.1
Aquaculture	25.2	26.8	28.7	30.7	32.9	35.0
Total inland	33.8	36.2	38.5	40.6	43.1	45.1
MARINE						
Capture	83.8	82.7	80.0	79.9	79.5	79.9
Aquaculture	16.7	17.5	18.6	19.2	19.7	20.1
Total marine	100.5	100.1	98.6	99.2	99.2	100.0
TOTAL CAPTURE	92.4	92.1	89.7	89.9	89.7	90.0
TOTAL AQUACULTURE	41.9	44.3	47.4	49.9	52.5	55.1
TOTAL WORLD FISHERIES	134.3	136.4	137.1	139.8	142.3	145.1
UTILIZATION						
Human consumption	104.4	107.3	110.7	112.7	115.1	117.8
Non-food uses	29.8	29.1	26.3	27.1	27.2	27.3
Population (billions)	6.4	6.5	6.6	6.7	6.8	6.8
Per capita food fish supply (kg)	16.2	16.5	16.8	16.9	17.1	17.2

Note: Excluding aquatic plants. Data for 2009 are provisional estimates.

Fig. 1 - Produzione globale di pesca e acquacoltura (FAO, 2010)

Il commercio dei prodotti ittici ha rappresentato nel 2008 il 10% del totale delle esportazioni di prodotti agricoli e ben l'1% (in valore) del commercio mondiale. L'importanza dei prodotti della pesca e dell'acquacoltura nel commercio internazionale di prodotti e mangimi di origine animale è aumentata considerevolmente dal 25%, nel 1976, arrivando fino al 39% nel 2008, riflettendo la crescita e l'espansione del settore ittico.

Nel 2008 infatti l'esportazione di prodotti della pesca ha raggiunto un valore di 102 miliardi di dollari, il 9% in più rispetto al valore del 2007 e quasi il doppio rispetto a quello registrato nel 1998.

L'acquacoltura, in continua crescita, è arrivata a coprire ben il 46% della quantità di pesce prodotto. A livello globale, la quantità attuale di prodotti ittici potrebbe coprire il 15% del fabbisogno di proteine animali di 3 miliardi di persone.

Grazie alla sua dimensione economica, essa favorisce la creazione di nuove nicchie economiche stimolando l'occupazione, un uso più razionale delle risorse locali e le opportunità d'investimento produttivo. Anche negli scambi, sia a livello locale che internazionale, l'acquacoltura va assumendo un peso crescente.

La maricoltura, avviata negli anni '70, è l'attività più recente e tecnicamente la più complessa. Fino agli inizi degli anni '90 era anche il più redditizio tra i comparti dell'acquacoltura, ragione per cui attirava nuovi investitori, con conseguente aumento della produzione che ha finito per inceppare il mercato e deprimere i prezzi. Anche questo comparto comincia a soffrire di problemi di impatto ambientale, originati dalla piscicoltura intensiva che fa largo uso di mangimi industriali. Tra le specie allevate predomina il salmone, sia in termini di quantità che di valore. Negli ultimi venti anni si è inoltre rapidamente sviluppato nel Mediterraneo l'allevamento di spigola e orata.

Il Mediterraneo è il più grande mare "chiuso" del mondo, con un'estensione di 2,5 milioni di Km² (3860 km di larghezza da est ad ovest e 900 km di massima distanza tra nord e sud) ed oltre 460 milioni di persone che risiedono nell'area (Cardia e Lovatelli, 2007).

Si è stimato che il totale ricambio d'acqua avviene ogni 100 anni. Il limitato apporto d'acqua e l'elevato livello di evaporazione rende il Mediterraneo più salato rispetto all'Atlantico. La sua temperatura va da un minimo di 10°C ad un massimo di 30°C (in queste condizioni non è possibile allevare salmoni o rombi) e la concentrazione di fosfati e nitrati è bassa, fattore che limita la disponibilità di cibo. In un contesto del genere il sovrasfruttamento delle risorse marine

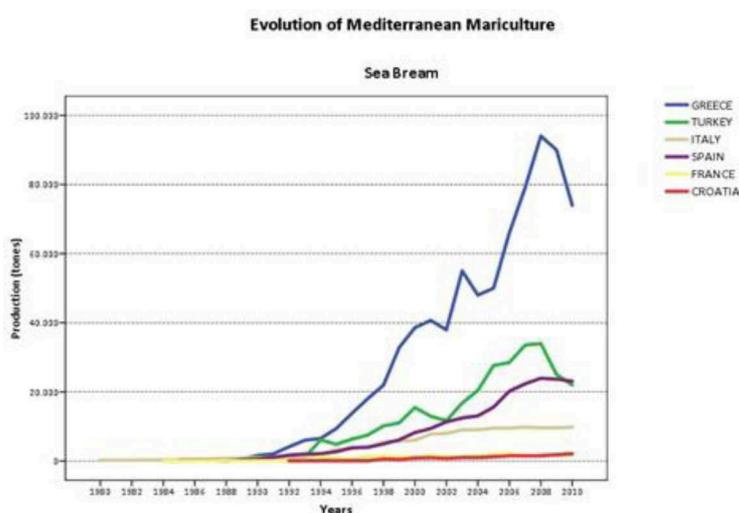
potrebbe diventare un serio problema nel tempo. Nonostante questo il Mediterraneo offre una vasta scelta di siti per l'allevamento, sia esposti che riparati.

La produzione di orata e spigola nel Mediterraneo ha mostrato un aumento costante nel periodo 1999-2009, giungendo a 175.196 tonnellate nel 2006, con un tasso medio di crescita annuo del 9,6%.

La Grecia detiene la maggior parte della produzione totale di orate e spigole del Mediterraneo (47,4%), seguita da Turchia (16,6%), Spagna (16,2%) ed Italia (10,2%), come riportato nelle tabelle seguenti.

Paese	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009
Albania	N.D	N.D	100	200	250	400	250	370	402	343	370
Bosnia	N.D	N.D	N.D	85	85	45	95	99	100 F	100 F	100 F
Cipro	986	1200	1300	1260	1500	1356	N.D.	1465	N.D.	N.D.	N.D.
Croazia	450	800	940	700	610	700	1000	1050	1150	1800	2200
Francia	1193	1180	1643	1361	1139	1379	1778	1609	1600	573,8	513,1
Grecia	32644	38347	40477	37687	43874	37197	43588	43613	49712	51705	60249
Italia	4800	5000	6800	4275	8000	5272	6432	5838	7003	3368,5	3320
Libia	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	61	61 F	60 F	60 F	60 F	60 F
Malta	1922	1512	1039	1066	794	743	540	912	1097	1574	1984
Montenegro	N.D	25 F	25 F	25 F	30 F						
Marocco	556	390	304	378	378	350	332	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Slovenia	30	27	7	12	16	31	2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Spagna	6117	8242	9382	9735	12317	14009	12908	14526	17987	16538	17292
Turchia	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	12000	13900	17500	22500	24000	27000	N.D.

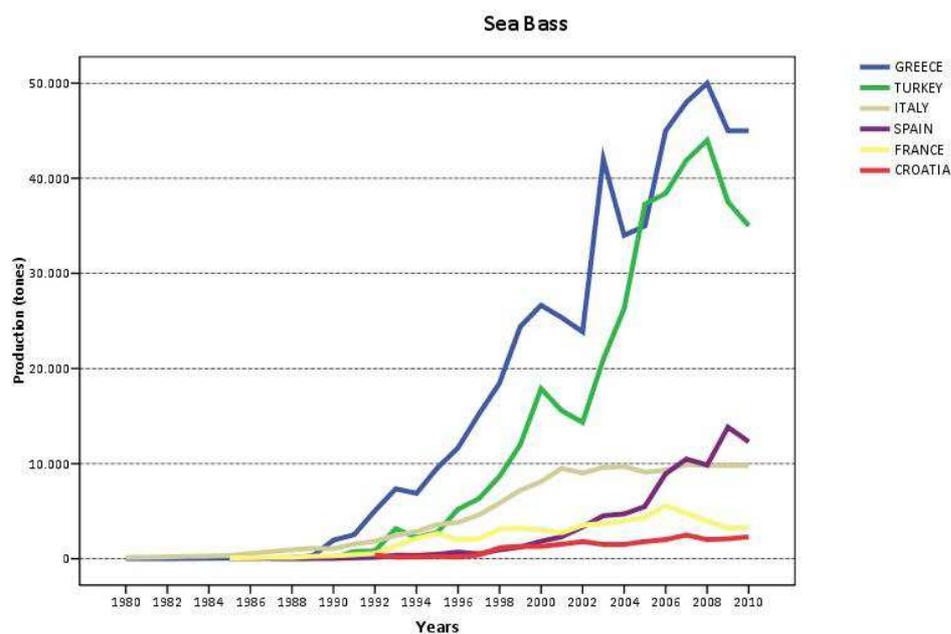
Produzione di orata in tonnellate – Fonte FishStatJ (FAO)



(da Christophiliogiannis, 2011)

Paese	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009
Bosnia	N.D.	N.D.	N.D.	85	85	47	86	84	80 F	80 F	80 F
Cipro	296	300	300	421	500	698	583	700	N.D.	N.D.	N.D.
Croatia	1300	1300	1520	1800	1813	2300	2000	2400	2800	2700	2800
Francia	3225	3020	2721	3536	3876	3438	3913	3239	3240	2246,5	1253,2
Grecia	24345	26519	25185	23763	27229	25687	30836	33884	34688	34956	33524
Italia	6600	7500	8900	5455	9000	5221	6096	6719	7189	3690,93	3800
Libia	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	170	170 F	170 F	170 F	170 F
Malta	80	234	196	50	93	125	196	155	75	97	93
Montenegro	N.D.	25 F	25 F	25 F	30 F						
Morocco	365	250	202	325	389	370	845	36	79	29	40
Slovenia	35	46	59	25	55	78	25	30	15	50	64,6
Spagna	1227	1837	2307	2846	3102	2970	5076	6690	7647	5309	6757,9
Turchia	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	15000	17000	21100	30000	35000	38000	
Tunisia	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	500	500	600	500	800	800	N.D.

Produzione di spigola in tonnellate – Fonte FishStatJ (FAO)



Per quanto riguarda i 6 principali paesi del Mediterraneo produttori di avannotti, le tabelle seguenti ne riportano le quantità nel periodo 2000-2006.

Produzione di avannotti di Orata in Europa (2000 - 2006)							
Paese	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006
Francia	19	23.5	21	19.5	24	34	36
Grecia	130	130	170	160	142	207	230
Spagna	42.4	53	53	64.2	48	56.2	68.7
Italia	40	40	40	30	40	45	54
Croazia	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	2	2
Cipro	15	30	15	14	9	8.1	9
<i>Produzione: in tonnellate</i>				<i>N.D.: dati non disponibili</i>			
Fonte: F.E.A.P. - Aquamedia							

Produzione di avannotti di Spigola in Europa (1999-2006)							
Paese	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006
Francia	22.5	22	23	29	28	33	35
Grecia	105	100	110	120	130	140	130
Spagna	9.3	8	8	13.5	19.2	23.2	24.6
Italia	50	50	50	45	50	50	52
Croazia	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	7	5	5
Cipro	2.5	3	4.5	3	5.6	3.3	4
<i>Produzione: in tonnellate</i>				<i>N.D.: dati non disponibili</i>			
Fonte: F.E.A.P. - Aquamedia							

La maricoltura in Grecia

La Grecia è l'unico paese dell'area mediterranea che presenta caratteristiche peculiari utili a supportare una forte crescita della maricoltura. Nonostante le dimensioni relativamente ridotte (131.940 Km²), la Grecia è circondata da 15.000 Km di costa con condizioni climatiche favorevoli, tanto che attualmente è il produttore leader di maricoltura del bacino del Mediterraneo con possibilità di ulteriore espansione delle attività produttive (Christophilogiannis, 2011).

La maricoltura greca è leader soprattutto nella produzione di orata (*Sparus aurata*) e spigola (*Dicentrarchus labrax*), con valori complessivi di 120.000 tons prodotte nel 2008, rappresentando infatti più del 95% della produzione totale della maricoltura greca.

In piccole quantità vengono prodotte anche le seguenti specie: pagro (*Pagrus pagrus*), sarago pizzuto (*Diplodus puntazzo*), pagello fragolino (*Pagellus erythrinus*), sarago maggiore (*Diplodus sargus*), tonno rosso (*Thynnus thynnus*), sogliole (*Solea solea*, *S. senegalensis*), cefali (*Mugil cephalus*), dentice (*Dentex dentex*) e ombrine.

Il settore produttivo della maricoltura è rappresentato da oltre 100 grandi aziende che danno occupazione (in modo diretto o indiretto) a 10.000 persone nelle più remote aree della Grecia. Principale caratteristica del settore è il forte orientamento all'esportazione (circa il 75% della produzione).

Sebbene siano presenti 106 aziende produttive, negli ultimi dieci anni si è registrata una forte concentrazione, con sei aziende che controllano il 60% della produzione nazionale e 16 aziende o gruppi di aziende che controllano il 70-75% della rimanente quota produttiva.

L'industria è integrata in senso verticale, con le 16 aziende più grandi che possiedono avannotterie proprie e le 3 maggiori che hanno propri impianti di produzione del mangime (producendo circa il 60% della produzione di mangime in Grecia) e di lavorazione.

La crescita della maricoltura greca è stata molto rapida soprattutto negli ultimi 15 anni, con emissione/attivazione di 318 licenze produttive che attualmente operano soprattutto in aree remote del paese.

Secondo il Ministero dello Sviluppo rurale e dell'alimentazione, le aziende di ingrasso erano 308 nel 2004, con un aumento del 9,2% rispetto al 2000, mentre gli incubatoi hanno raggiunto il numero di 37 nel 2004, sostanzialmente invariato rispetto alle 36 aziende del 2000.

Dal 1990 al 2002 la produzione di orata e spigola è aumentata in misura significativa. L'aumento della produzione a causa del costante afflusso di nuove imprese nel settore, dati gli incentivi finanziari concessi per lo sviluppo di attività, borse di studio, finanziamenti, ha comportato un calo dei prezzi di vendita di orate e spigole, che, in alcuni casi ha raggiunto livelli al di sotto dei costi di produzione con forti ripercussioni anche sui mercati dove il pesce greco viene importato e commercializzato.

La produzione interna di orate e spigole ha mostrato un tasso medio di crescita annuale del 25,5% dal 1993 al 2002. Nel biennio 2003-2004 il prodotto totale era sceso di 4000 t, con un calo del 4,5% rispetto al 2002. Successivamente si è registrato di nuovo un aumento della produzione di entrambe le specie ittiche, che si è attestata nel 2006 a 90.000 tonnellate, con un aumento del 2,3% rispetto al 2005. Nel 2007 fino al 2010 si è assistito ad una nuova importante contrazione del mercato.

Le due crisi (2002-2004 e 2007-2010) si sono verificate a seguito della carenza di precauzioni commerciali in presenza di un aumento del flusso di prodotto sul mercato associato ad una crescita della domanda molto più lenta. Nel 2011 i prezzi di mercato, soprattutto per l'orata, sono stati i migliori degli ultimi dieci anni, quindi si suppone che l'industria stia andando verso un nuovo periodo di crescita.

Per quanto riguarda la produzione greca di avannotti di spigola e orata si è assistito ad un notevole aumento nel periodo 1990-2006, con un tasso medio di crescita annuo del 24,6% che ha raggiunto la cifra di 370 milioni di avannotti nel 2006 contro una produzione di 11 milioni di avannotti nel 1990.

Produzione di avannotti in Grecia

Specie	2007	2008	2009
Spigola	117.551	134.101	160.865
Orata	269.862	270.232	186.266
Totale	389.420	406.341	349.140

La maricoltura in Italia

Nel 2009 la produzione ittica si attestava a circa 475 mila tonnellate, in crescita di appena il 2,2% rispetto al 2008 per un valore complessivo che ha superato di poco 1,8 miliardi di euro (+5,3%) (ISMEA, 2010).

Il modesto incremento della produzione e dei ricavi si è rivelato del tutto insufficiente a recuperare la netta flessione registrata nel 2008, anno in cui il livello produttivo in Italia aveva toccato la quota più bassa dall'inizio del nuovo millennio (-11,3% sul 2007) e in cui anche gli introiti avevano subito un netto ridimensionamento (-15,2%). In generale, il calo della produzione del settore sembra assumere un carattere continuativo, come si evince dal tasso di variazione medio annuo tra il 2004 e il 2009 (-2,4%). Nello stesso periodo i proventi hanno registrato in media una flessione annua del 2,1%. Osserva (ISMEA, 2010).

Dai risultati del 2009 emergono incrementi significativi solo per le catture in mare, in aumento dell'8,1% a fronte di una nuova contrazione della produzione proveniente dall'acquacoltura (-2,3%, che segue il -3,9% del 2008), a causa della riduzione di oltre il 4% della molluscoltura.

Anche l'import-export ha subito una flessione nel 2009 infatti sia le importazioni, che le esportazioni sono rimasti, in volume, sostanzialmente invariate rispetto ai livelli del 2008.

Riguardo infine ai consumi, il 2009, limitatamente agli acquisti domestici, ha chiuso con aumenti in termini quantitativi del 2,9% per il pesce fresco e del 3,4% per quello trasformato. La dinamica positiva non sembra però confermata

nel 2010, che in 10 mesi ha già mostrato un contrazione del 5,5% degli acquisiti di pesce fresco e una sostanziale tenuta del segmento trasformato.

Negli ultimi anni il consumo di pesce è cresciuto in modo considerevole ma la domanda è stata soddisfatta principalmente con le importazioni, visto che né la pesca né l'acquacoltura sono riuscite, per ragioni diverse, a mantenere i necessari ritmi di sviluppo. In Italia l'attività ittica contribuisce al risultato economico complessivo del Paese in termini poco significativi. Tuttavia essa assume rilievo per gli aspetti socio-economici connessi e per la crescente attenzione che, a livello nazionale e internazionale, si sta ponendo allo sfruttamento delle risorse idro-biologiche e al conseguente progressivo impoverimento degli stock.

L'acquacoltura italiana è caratterizzata da una rilevante diversificazione in termini di sistemi produttivi, di tecnologie adottate e di specie allevate. Presente in tutte le regioni italiane, l'acquacoltura rispecchia le diversità geografiche ed ambientali del territorio nazionale.

Nel complesso, con poco meno di un migliaio di impianti attivi, l'acquacoltura ha contribuito nel 2008 al 51% della produzione ittica nazionale (pesca marittima e acquacoltura) e al 35% dei ricavi complessivi, con circa 238 mila tonnellate per un valore di 607 milioni di euro. I dati strutturali e produttivi di settore mettono in evidenza le seguenti caratteristiche dell'offerta:

- tra gli impianti attivi, 534 (oltre la metà) operano nel comparto della piscicoltura intensiva (allevamenti di trote, anguille e storioni a terra, di spigole e orate e altre specie a terra e a mare), a cui vanno aggiunti circa 100 allevamenti di altre specie di acqua dolce (carpe, pesci gatto) e specie allevate nelle valli e nei laghi costieri (spigole, orate, anguille e cefali); 359 (oltre un terzo del totale) riguardano la molluschicoltura (mitili e vongole), mentre esiguo è il numero e limitata è la consistenza produttiva degli impianti di crostaceicoltura;
- la localizzazione geografica degli allevamenti intensivi (piscicoltura e molluschicoltura) mette in evidenza il ruolo predominante delle regioni del Nord, seguite da quelle del Sud: tra le prime, spicca fra tutte il Veneto, seguito da

Friuli Venezia Giulia, Lombardia e Liguria; tra le seconde emergono Puglia e Sardegna. Di rilievo anche il peso della Toscana tra le regioni centrali;

- in termini di offerta nazionale, nel 2008 poco meno del 70% della produzione ittica proveniente dall'attività dell'acquacoltura è risultata composta da molluschi bivalvi – i mitili sono la specie più prodotta – mentre il restante 30% da prodotti della piscicoltura; in valore, dato il basso valore medio unitario dei mitili, l'incidenza della molluschicoltura sui ricavi complessivi del settore è risultata di poco superiore al 43%. Piscicoltura e molluschicoltura da un lato, allevamenti intensivi e estensivi dall'altro sottintendono, in realtà, una struttura produttiva molto più articolata e diversificata in termini di sistemi aziendali, tecnologie adottate, rilevanza ambientale ed economica.

Gli allevamenti intensivi di spigole, orate e altre specie marine (dentici, saraghi, ombrine, ecc.), complessivamente 126 nel 2006, sono localizzati prevalentemente al Sud e nelle Isole, dove sono concentrati circa due terzi degli impianti che contribuiscono per un 56% alla produzione complessiva nazionale. Puglia e Sardegna contano il numero più elevato di impianti a terra, mentre Calabria, Sicilia e ancora Sardegna prevalgono se si prendono in esame le gabbie a mare. Tra le altre regioni, spiccano il Veneto (dove vi sono quasi esclusivamente impianti a terra) e la Toscana (dove le gabbie a mare rappresentano un terzo del totale degli impianti della regione). Agli allevamenti intensivi vanno aggiunti gli impianti vallivi e salmastri, dove sono allevate spigole e orate, oltre a anguille e cefali.

I dati aggiornati al 2010 delle produzioni di acquacoltura in Italia vengono riportati qui di seguito:

Allevamenti : circa 1.000 siti produttivi a terra, mare, valli, laghi salmastri

Addetti al "sistema acquacoltura" compreso l'indotto : 15.000

Aree di produzione: nord: 60%,centro: 18%,sud: 22%

Specie allevate:

- branzino/spigola ton. 9.800
- orata - ton. 8.800 -
- ombrina- ton. 320

- ictaluridi (pesce gatto europeo - americano)- ton. 550
- ciprinidi (carpa, tinca, ecc...)-ton. 700 -
- anguilla -ton. 1.200
- trota (iridea, fario, ecc.)- ton. 40.000
- acipenseridi (storione)- ton. 1.380
- altri (sarago, tonno, cefalame, persico spigola, luccio, salmerino, etc...)- ton. 5.600

(per orate e spigole: compresa la produzione di valli e laghi salmastri.

Dati API 2010

PRODUZIONE DELL'ACQUACOLTURA ITALIANA IN TONNELLATE E CORRISPETTIVO VALORE IN MIGLIAIA DI EURO PER IL 2010				
SPECIE	Impianti a terra e a mare (tonnellate)	Impianti vallivi e salmastri (tonnellate)	TOTALE (tonnellate)	VALORE (migliaia di euro)
SPIGOLA	9.100	700	9.800	70.500
ORATA	8.100	700	8.800	57.200
OMBRINA	300		300	2.100
ANGUILLA	1.100	100	1.200	11.200
CEFALI		3.800	3.800	12.000
TROTA	40.000		40.000	(*) 145.000
PESCE GATTO	550		550	3.300
CARPE	700		700	2.600
STORIONE (**)	1.380		1.380	14.000
ALTRI PESCI (***)	5.600		5.600	17.000
TOTALE PISCICOLTURA	66.830	5.300	72.130	334.900
MITILI			120.000	78.000
VONGOLA VERACE			40.000	144.000
TOTALE MOLLUSCHI			160.000	222.000
TOTALE ACQUACOLTURA			232.130	556.900

(*) viene considerato anche il valore aggiunto per il prodotto trasformato fresco in azienda.

(**) escluso il valore prodotto dal caviale

(***) tonno, dentice, sarago, persico spigola, salmerino, luccio, etc.



elaborazioni dati API 2011

L'acquacoltura in sistema estensivo si basa sull'utilizzo delle risorse trofiche di ecosistemi confinati ma naturali da parte degli organismi "oggetto" dell'attività di allevamento. Nell'acquacoltura estensiva condotta in acque marine o salmastre gli organismi allevati appartengono generalmente a specie eurialine, quali ad esempio anguille, spigole, orate, mugilidi. L'intervento dell'uomo può limitarsi al solo controllo idraulico o spingersi all'incremento delle produzioni attraverso la semina di materiale ittico allo stadio giovanile, il controllo dei predatori, le concimazioni e la somministrazione di diete integrative (Cataudella *et al.*, 2001).

L'acquacoltura semi-intensiva è una metodica produttiva che da un punto di vista gestionale, risulta intermedia tra i sistemi intensivi ed estensivi e che prevede la somministrazione di alimenti. L'accrescimento dei soggetti in questa tipologia d'allevamento dipende infatti sia dalla disponibilità di alimento naturale che da quello somministrato dall'uomo con funzione di dieta integrativa (Massa *et al.*, 2000).

Vengono di seguito riportate le principali caratteristiche dell'allevamento intensivo, con un approfondimento specifico dei sistemi in gabbia.

ALLEVAMENTO INTENSIVO

La forte richiesta di specie ittiche pregiate come la spigola (*Dicentrarchus labrax*), l'orata (*Sparus aurata*) e il sarago pizzuto (*Diplodus puntazzo*), unitamente alla messa a punto di tecnologie capaci di ovviare ai limiti produttivi legati alle risorse ambientali, hanno rappresentato la spinta per l'intensificazione delle colture a livello mondiale.

Impianti intensivi sono stati realizzati basandosi principalmente sul potenziale ambientale (acqua, seme, superfici, mano d'opera, ecc.), ma non per questo sempre in sintonia con l'ambiente nel quale erano inserite (Bronzi *et al.*, 2001).

L'allevamento intensivo è caratterizzato da elevate densità di biomassa allevata per unità di superficie e di volume, con una somministrazione alimentare completamente dall'esterno. Prevede investimenti elevati,

disponibilità di aree con acque di buona qualità con temperature idonee alla crescita della specie allevata. Questo tipo di attività può operare ad elevate densità di stoccaggio, da pochi ad oltre cento chili per metro quadro (kg/m²) o per metro cubo(kg/m³).

L'allevamento richiede approvvigionamenti idrici elevati e appositi meccanismi di aerazione ed ossigenazione allo scopo di garantire un valore ottimale di ossigeno disciolto nell'acqua (Massa *et al.*, 2000).

In questi impianti, il ciclo parte dai riproduttori reperiti in natura. Tramite trattamento ormonale o condizionamento con il fotoperiodo, si stimola la maturità sessuale e l'emissione dei gameti. Si procede quindi alla fecondazione delle uova in ambiente controllato (avannotteria) e, in successione, si conducono la schiusa e lo sviluppo delle larve in ambienti condizionati. In parallelo, in appositi laboratori annessi, si procede alla produzione di fito- e zoo-plancton che costituiscono la prima alimentazione e le prime prede differenziate delle larve e post-larve di orate e spigole.

Si segue in fine tutta la fase di accrescimento dei giovani pesci (avannotti) mediante diete controllate basate sulla somministrazione di mangimi industriali bilanciati (www.milleunoalimenti.it).

Gli impianti intensivi devono essere tenuti costantemente sotto controllo dal punto di vista igienico-sanitario, in quanto le alte densità generalmente applicate possono favorire l'insorgenza di tecnopatie e la diffusione di agenti patogeni.

Le produzioni più elevate sono ottenute introducendo dall'esterno ciò che il sistema naturale non è in grado di fornire in quantità adeguate per sostenere la biomassa, in particolare il cibo ed ossigeno, operando inoltre la rimozione dei cataboliti.

Allo stato attuale, pur considerando positivamente il contributo dell'acquacoltura, quale attività in grado di ridurre la dipendenza alimentare e lo sfruttamento delle risorse naturali, è crescente la preoccupazione legata all'impatto che questa tipologia di allevamento può esercitare sull'ambiente (Bronzi *et al.*, 2001).

ALLEVAMENTO INTENSIVO IN GABBIE A MARE

Sviluppo tecnologico ed evoluzione dei mercati stanno determinando in molti paesi una crescita del tutto inaspettata della maricoltura in gabbie. I minori costi di investimento e di gestione rispetto agli allevamenti a terra e, nel contempo, le elevate produzioni ottenibili sono alla base di questa diffusione (Bronzi *et al.*, 2001).

Le gabbie, secondo la concezione più moderna, sono composte da una struttura rigida che mantiene aperta una rete a sacco, che confina il volume idrico dove è allevato il prodotto.

La struttura rigida, più o meno flessibile, viene tenuta a galla da appositi galleggianti, nel caso sia una gabbia galleggiante, immersa a profondità variabile, oppure ormeggiata fissa sul fondo.

Questa è ancorata con corde e catene a corpi morti in cemento armato che poggiano sul fondale marino; il peso dei corpi morti è in funzione del modello di gabbia e delle condizioni meteomarine cui è esposto il sito (Massa *et al.*, 2000).

Le forme delle gabbie sono variabili a seconda dello scopo per le quali sono utilizzate, delle specie da allevare, dei materiali di costruzione, dell'ambiente di installazione, ecc. Le forme più comuni sono rettangolare, quadrata, esagonale o circolare. I moduli possono essere installati singolarmente o a gruppi; il sistema di ancoraggio è una caratteristica peculiare del modulo e dipende dal materiale, dalla grezza della gabbia, dal sito di installazione e dalla profondità dell'acqua.

I materiali di costruzione della struttura rigida sono vari; quelli più utilizzati sono l'acciaio ed il polietilene ad alta densità.

In condizioni particolari come i siti marini protetti o ambienti lacustri è possibile utilizzare semplici pali di legno.

Alcuni modelli sono dotati di sistemi pneumatici per la variazione di assetto e presentano varie soluzioni per l'alimentazione degli animali (Massa *et al.*, 2000).

Le principali forze che agiscono sulle gabbie sono due: statica e dinamica. La pressione statica verticale è dovuta a: peso della rete, fouling, biomassa del pesce, peso delle funi, peso delle strutture del telaio, zavorre. Le principali forze dinamiche che agiscono sulle gabbie sono: azione orizzontale delle correnti, azione del vento che induce la formazione delle onde, causa anche di impatti con corpi alla deriva.

La funzione della rete delle gabbie è fondamentale in quanto, oltre a confinare il prodotto, deve garantire un efficiente scambio idrico necessario a trasportare l'ossigeno per il pesce allevato. Le reti hanno un'importanza rilevante sia per le loro caratteristiche di resistenza che per evitare che il prodotto si danneggi. Le reti moderne sono composte di fibre sintetiche: poliammide (nylon), poliestere, polietilene, polipropilene (Massa *et al.*, 2000).

La taglia degli animali allevati condiziona le dimensioni delle maglie delle reti, da 4 a 25 mm di lato, fino ad arrivare a 50-70 mm (allevamento dei tonni) (Bronzi *et al.*, 2001)

Le gabbie, siano esse di tipo galleggiante, sommerse, sommergibile, rappresentano sicuramente una valida alternativa alle strutture d'allevamento tradizionali.

VANTAGGI: riduzione dei costi di investimento a parità di volume produttivo rispetto agli impianti a terra; utilizzo di corpi idrici esistenti; riduzione dei costi di produzione poiché non sono previste spese per il pompaggio dell'acqua; possibilità di dislocare facilmente in altri siti le strutture; facilità di ampliamento dell'impianto; utilizzo diretto del mare evitando il conflitto delle aree della fascia costiera; migliore qualità dell'acqua con riduzione dell'incidenza delle patologie; minore impatto ambientale.

SVANTAGGI: esposizione all'inquinamento; vandalismo; difficoltà nell'eseguire interventi di cura e profilassi del prodotto; necessità di personale specializzato (tecnici e subacquei); conflitto con la realtà peschereccia locale (Massa *et al.*, 2000).

Una tecnologia, quindi, estremamente versatile, proponibile in situazioni e contesti del tutto diversi, purché si disponga di personale esperto nel lavoro in

mare, formato ai valori etici, economici ed ecologici, presupposto per un'acquacoltura responsabile e sostenibile. Le risorse umane appropriate, pescatori, sommozzatori, biologi, possono coniugare l'allevamento con la tutela delle risorse marine rinnovabili, facendo della maricoltura uno strumento di gestione ambientale. L'ulteriore sviluppo tecnologico delle gabbie riguarda l'allevamento di specie pelagiche non allevabili negli impianti a terra, come tonni (*Thunnus thynnus*) e ricciole (*Seriola dumerilii*), importanti per le prospettive future dell'acquacoltura.

Per analizzare i "punti di forza e di debolezza" delle diverse tecnologie, vengono identificate le 4 categorie delle gabbie, fisse, galleggianti, ad assetto variabile (sommersibili) e sommerse (Bronzi *et al.*, 2001).

GABBIE FISSE

Le gabbie fisse possono essere installate solo in zone molto riparate da venti e mareggiate. Le strutture portanti per sostenere le reti sono costruite con materiali poco costosi, come assi e pali di legno. La forma è generalmente quadrata o rettangolare. Sono realizzate anche in plastica (polietilene); le dimensioni in genere non superano i 7mx7mx3m (h). Sono diffuse soprattutto nei Paesi in Via di Sviluppo, nelle lagune e nei delta dei grandi fiumi, per l'allevamento di tilapia e pesce gatto. Non mancano esempi in Mediterraneo, ove si allevano spigole, orate e saraghi. Le produzioni unitarie si aggirano sui 7 kg per m³, aumentabili con ricambio idrico forzato e impiego di ossigeno liquido. Tra le tecnologie di supporto, gli alimentatori automatici per il risparmio di manodopera. La gestione routinaria (alimentazione, controllo dell'allevamento, cambio delle reti) comporta almeno 3 persone, per un impianto di 10 gabbie. Con un volume totale di allevamento di circa 1.500 m³, la produzione annua è di 100 quintali. In Italia sono presenti pochi impianti di questo tipo per le caratteristiche delle nostre coste. Il potenziale impatto sull'ambiente, determinato dal metabolismo degli animali allevati e dai ricambi idrici generalmente limitati, non ne permette lo sviluppo, ad eccezione di contesti del tutto particolari (Bronzi *et al.*, 2001).

GABBIE GALLEGGIANTI

Le tecnologie delle gabbie galleggianti flessibili offrono soluzioni impiantistiche sia per siti protetti sia esposti.

GABBIE GALLEGGIANTI SOTTO COSTA: il modello più diffuso è la gabbia circolare con 2 collari concentrici in polietilene ad alta densità (HDPE) come struttura portante galleggiante. Una passerella modulare facilita l'attracco delle imbarcazioni di servizio e quindi il controllo dell'allevamento (manutenzioni, cambio rete, alimentazione, pesca degli animali). Le reti sono fissate alla struttura in HDPE e mantenute aperte da zavorre e anelli rigidi di tensionamento. Il volume delle gabbie raggiunge 4.000 m^3 , con diametri di 10-24 m. Resistono a mareggiate di non forte intensità, con altezze d'onda significative di 1-1,5 m.

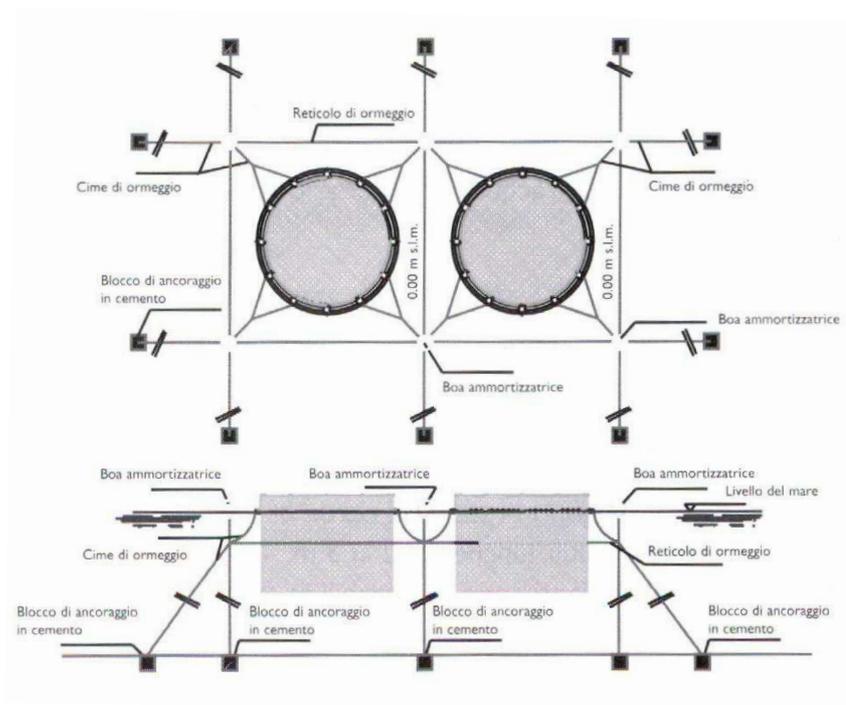
Un altro esempio è dato dalle gabbie organizzate in moduli (pontoni), che presentano spazi per lo stoccaggio di mangime e attrezzature, locali per il personale (manutenzione e sorveglianza), passerelle di camminamento utili alla gestione. Una struttura per siti riparati prevede 12 gabbie quadre di 15 m di lato, per una superficie di 2700 m^2 ; il volume dipende dall'altezza scelta per la rete.

GABBIE GALLEGGIANTI FUORI COSTA: per i siti esposti si usano gabbie con diametri maggiori, in grado di resistere ad onde con altezza significativa di 6-7 m, con ormeggi e ancoraggi più elastici e resistenti. Con il polietilene si realizzano gabbie con 30-50 m di diametro e volumi di $10.000\text{-}40.000 \text{ m}^3$. Un altro tipo di struttura portante è realizzata con tubolari in gomma di 16-20 m, riempiti d'aria a bassa pressione. Le gabbie sono poligonali (quadrate, esagonali, ottagonali) con capacità fino a 40.000 m^3 (Bronzi *et al.*, 2001). L'allevamento in mare aperto, proprio per le condizioni più impegnative in cui si effettua, ha portato allo sviluppo di tecnologie di supporto, in grado di agevolare il lavoro. Tra queste, i sistemi automatici di guardia (telecamere ed avvisatori acustici), sonde con hardware e software per il monitoraggio a distanza

(ondametri, sensori per ossigeno e temperatura), telecamere per il controllo dell'allevamento e dello stato delle gabbie.

Le gabbie di 2.000-4.000 m³ di volume costituiscono una valida sintesi costi/prestazioni per spigole, orate, saraghi e ricciole, con produzioni unitarie di 10-15 kg/m³, per 20-60 tonnellate/gabbia. La gestione comporta almeno 3 addetti per un modulo di 2 gabbie in siti riparati; mentre per siti esposti sono necessarie almeno 4 persone. Gabbie galleggianti di 50 m di diametro e 50.000 m³ sono idonee all'allevamento del tonno, con produzioni (capacità di stoccaggio) finali di 15-40 tonnellate/gabbia, sulla base di precise scelte manageriali. Occorre prevedere almeno 4 persone per la gestione routinaria di 1 gabbia. La tecnologia per siti riparati ha come punto di forza un minor costo di impianto.

Gestione e manutenzioni sono semplificate dal punto di vista tecnico e meno onerose da quello economico. In Italia, però, conflitti con altre attività, come turismo e navigazione, limitano lo sviluppo della maricoltura in siti riparati (Bronzi *et al.*, 2001).



Gabbia galleggiante: pianta prospetto e ancoraggio

Nelle gabbie in HDPE l'alimentazione degli animali è manuale; quando sono sommerse, un tubo in plastica permette l'invio del mangime all'interno della gabbia mediante aria compressa. Le gabbie ad assetto variabile di 3.000-4.000 m³ sono una buona sintesi costi/benefici per spigole, orate, saraghi, ricciole, con densità di allevamento di 10-15 kg/m³ e produzioni fino a 300-450 quintali/gabbia. Per la gestione sono necessari 4 addetti per gestire un modulo di 2 gabbie (Bronzi *et al.*, 2001).

GABBIE SOMMERSE

Non esistono molte applicazioni di gabbie sommerse. Hanno generalmente struttura in acciaio simile alle gabbie sommergibili. Una gabbia sommersa è stata installata presso l'isola di Lampedusa, realizzata in acciaio, con un volume di 1.100 m³, provvista di un sistema di zavorra pneumatico, un sistema di alimentazione automatico e un silos per lo stoccaggio del mangime (Bronzi *et al.*, 2001).

PRINCIPALI MALATTIE PARASSITARIE DEI PESCI MARINI D'ALLEVAMENTO

Le principali malattie parassitarie che colpiscono le specie ittiche marine d'allevamento sono elencate nella tabella sottostante.

Malattia	Agente eziologico	Localizzazione
Amiloodinosi	<i>AMILOODINIUM OCELLATUM</i>	Branchie e cute
Malattia dei puntini bianchi	<i>CRYPTOCARYON IRRITANS</i>	Branchie e cute
Criptobiosi	<i>CRYPTOBIA BRANCHIALIS</i>	Branchie e cute
Tricodinosi	<i>TRICHODINA</i> SPP. / <i>TRICHODINELLA</i> SPP.	Branchie e cute
Infezione da peritrichi sessili	<i>EPISTYLIS</i> SP., <i>APIOSOMA</i> SP., ECC.	Branchie e cute
Coccidiosi	COCCIDI: <i>EIMERIA</i> SPP.	Intestino
Microsporidiosi	<i>KABATANA</i> SP., <i>GLUGEA</i> SP.	Muscolo, Intestino
Enteromyxosi degli Sparidi	<i>ENTEROMYXUM LEEI</i>	Intestino + vescica biliare
Sferosporosi della spigola	<i>SPHAEROSPORADICENTRARCHI S. TESTICULARIS</i>	Intestino, vescica biliare, ecc.
Diplectanosi	<i>DIPLECTANUM AEQUANS</i>	Branchie
Sparicotilosi	<i>SPARICOTYLE CHRYSOPHRII</i>	Branchie
Infestazioni da crostacei Isopoda e Copepoda	ISOPODA (CYMOTHOIDAE, GNATHIDAE, ECC.) E COPEPODA (<i>CALIGUS</i> SPP.)	Cute e cavo orale + branchie

Vengono qui di seguito descritti in modo sintetico, visto che saranno trattati nel dettaglio nella parte relativa ai Risultati i più importanti parassiti cutanei e branchiali descritti quale causa di malattia nelle orate e nelle spigole d'allevamento.

AMYLOODINIUM OCELLATUM

Phylum: Sarcomastigophora

Classe: Phytomastigophorea

Ordine: Dinoflagellida

Famiglia: Oodinidae

Genere: *Amyloodinium*

Specie: *A. ocellatum*

Amyloodinium ocellatum Brown, 1931, protozoo dinoflagellato agente eziologico della amiloodiniosi o "malattia del velluto", causa una delle malattie parassitarie più importanti dei pesci marini (Becker, 1977; Lauckner, 1984; Noga, 1996)..

Il ciclo biologico diretto e polifasico di *A. ocellatum* è regolato in modo primario dalla temperatura: tra 23 e 27°C può realizzarsi in meno di una settimana. La localizzazione primaria di *Amyloodinium ocellatum* è prevalentemente branchiale ma i trofonti possono localizzarsi anche su cute, sulle pseudobranchie e nelle fossette nasali (Lawler, 1980).

La diagnosi si basa essenzialmente sull'individuazione del parassita in raschiati cutanei e branchiali mediante osservazione microscopica a fresco, facilitata dall'aggiunta di Lugol al preparato (Lawler, 1980; Noga, 1996).

Le nuove metodiche diagnostiche su base molecolare sono state sviluppate recentemente da Levy e Noga (2005) e Levy *et al.* (2007)

La prevenzione dell'amiloodiniosi si basa sulla quarantena dei pesci di nuova introduzione per un periodo la cui durata varierà in base alla temperatura dell'acqua e, quando ciò non è possibile, sul controllo parassitologico di un numero significativo di soggetti. Nelle avannotterie il trattamento dell'acqua in entrata con filtri UV è efficace nel devitalizzare le dinospore infettanti. Sebbene non autorizzato per l'acquacoltura, il solfato di rame a dosi di 1 ppm per 1 ora o 0,1 ppm per 7-10 giorni (dosi relative a ioni Cu liberi) può risultare efficace nel trattamento dell'infezione.

CRYPTOCARYON IRRITANS

Phylum Ciliophora

Classe Prostomatea

Ordine Prorodontida

Famiglia Cryptocaryonidae

Genere *Cryptocaryon*

Specie *C. irritans*

Cryptocaryon irritans è un protozoo ciliato in grado di parassitare numerose specie ittiche marine (Burgess & Matthews, 1995) in particolare dove la temperatura dell'acqua è superiore ai 19°C. In passato rappresentava una seria problematica nei paesi con mari più caldi ma recentemente ed in conseguenza al riscaldamento globale vien segnalato come agente patogeno anche in maricoltura mediterranea (Rigos *et al.*, 2001).

Presenta un ciclo biologico diretto con fasi di sviluppo sull'ospite pesce (trofonti) e altre fasi libere nell'ambiente acquatico. Da un punto di vista strettamente sanitario, appare importante la riproduzione del parassita sul fondo, con accumulo di cisti riproduttive (tomonti) e massiva produzione di stadi infettanti (teronti) soprattutto in ambienti d'allevamento caratterizzati da scarso ricambio idrico, scadente gestione igienico-sanitaria del fondo e breve distanza tra fondo ed ospite pesce. La diagnosi è piuttosto facile e consiste nell'individuazione dei trofonti maturi all'esame microscopico a fresco di raschiati cutanei e branchiali. La sintomatologia è strettamente dipendente da fattori abiotici quali temperatura e salinità e soprattutto dalla carica infestante. Nelle infezioni gravi la mortalità può risultare elevata (Bruno *et al.*, 1997).

La profilassi della criptocarionosi si basa sulla quarantena e sull'applicazione di buone prassi igienico-sanitarie in allevamento, mentre per il controllo risultano efficaci solo composti non autorizzati come il solfato di rame, in particolare se applicato nel periodo notturno, poiché sembra che la fuoriuscita dei teronti dalla cisti riproduttiva e dei trofonti/tomonti dall'ospite avvengano in assenza di luce (Colorni, 2005).

TRICHODINA SPP.

Phylum: Ciliophora

Classe: Oligohymenophorea

Ordine: Peritrichida

Sottordine: Mobilina

Famiglia: Trichodinidae

Genere: *Trichodina*

Agente eziologico della trichodinosi, comprende diverse specie di ciliati peritrichi a forma di disco piatto emisferico, con nucleo a ferro di cavallo e ciliatura somatica ridotta a 3-4 giri intorno alla superficie aborale caratterizzata da un disco adesivo a ventosa dotato di dentelli che permette di aderire ai substrati, fra cui anche cute e branchie di pesci. Questi ciliati sono dotati di un *velum* per il movimento, si riproducono per fissione binaria longitudinale ed hanno ciclo biologico diretto. Il diametro è in genere tra 50 e 100 μm , a seconda della specie considerata (Lom & Dyková, 1992).

Si tratta di ciliati a diffusione cosmopolita nel mezzo acquatico e, sebbene la maggior parte delle specie di *Trichodina* possano essere considerate ectocommensali, in taluni casi possono essere patogene in via primaria (alcune specie sono considerate parassiti obbligati) o secondaria.

Il pesce infetto spesso mostra un comportamento letargico, perdita di peso con bruschi movimenti quando cerca di sbarazzarsi dal parassita. Quando sono presenti in elevate quantità possono determinare iperproduzione di muco, "intorbidimento" cutaneo, erosioni talvolta a carattere emorragico, iperplasia branchiale e problemi respiratori (Lom, 1995).

La trichodina può infettare quasi tutte le specie ittiche direttamente o indirettamente causando la morte.

La diagnosi è esclusivamente da esame microscopico, spesso si è visto gonfiore delle branchie.

Sebbene non autorizzato per l'acquacoltura i trattamenti chimici con formalina, solfato di rame (CuSO_4), permanganato di potassio (KMnO_4) possono uccidere le trichodine con un singolo trattamento. (Robert M. Durbin, 2003).

PERITRICHICI SESSILI

Phylum: Ciliophora

Classe: Oligohymenophorea

Ordine: Peritrichida

Sottordine: Sessilina

Famiglia: Epistylididae

Genere: Epistylis, Apiosoma

Peritrichi sessili sono dei protozoi ciliati sessili, presentano un corpo cilindrico, conico o a campana, sempre attaccato ad un substrato, la ciliatura somatica è ridotta ad una fila equatoriale, l'organo di attacco (scopula) risiede a livello del polo antiapicale. Il ciclo biologico è diretto.

Benché considerati ectocommensali, possono provocare lesioni in pesci debilitati o stressati e con invasioni massive dell'epitelio branchiale possono causare ridotta funzionalità respiratoria

e maggiore suscettibilità agli stress (Lom, 1995). L'applicazione di bagni di permanganato di potassio 2 ppm o formalina 15 ppm (Rogers, 1971) pur essendo prodotti non autorizzati in acquacoltura, possono dare buoni risultati.

CRYPTOBIA BRANCHIALIS

Phylum Sarcomastigophora

Classe Kinetoplastidea

Ordine Kinetoplastida

Famiglia Bodonidae

Genere *Cryptobia*

Specie *C. branchialis*

Cryptobia branchialis, agente eziologico della cryptobiosi cutaneo-branchiale, è un protozoo flagellato dal corpo allungato od ovale con 2 flagelli che originano dalla porzione anteriore (uno è ricorrente ed esce libero all'estremità posteriore), di dimensioni in genere intorno a 10 µm e con riproduzione per fissione binaria longitudinale.

Diversamente da specie ematozoiche congeneriche, *C. branchialis* ha ciclo diretto e si trasmette direttamente, favorito da condizioni di scarso ricambio idrico, elevato carico organico ed elevate densità di biomassa.

La distribuzione geografica di *C. branchialis* è strettamente correlata alla presenza ed all'ecologia degli ospiti in acque salate e salmastre, temperate e calde.

I pesci massivamente parassitati possono mostrare appetito capriccioso fino ad anoressia, iperproduzione di muco, iperplasia dell'epitelio branchiale ed emorragie. L'esame a fresco di preparati ottenuti per raschiamento da branchie o cute fornisce una rapida diagnosi, poi confermata mediante osservazione di preparati a secco colorati con Giemsa e/o di sezioni istologiche.

La profilassi/controllo consiste nel migliorare la qualità dell'acqua, operando la pulizia periodica del fondo e l'aumento del ricambio idrico.

I bagni con formalina (150 ppm), pur non essendo autorizzati in acquacoltura, si sono dimostrati efficaci nel controllo del parassita, sebbene in relazione al carattere opportunisto di *C. branchialis* risultino importanti gli interventi volti a migliorare la qualità dell'ambiente d'allevamento (Bruno *et al.*, 1997).

ICHTHYOBODO SP.

Phylum Sarcomastigophora

Classe Kinetoplastidea

Ordine Kinetoplastida

Famiglia Bodonidae

Genere *Ichthyobodo*

Specie: *I. necator*

Ichthyobodo necator ("Costia") è un protozoo flagellato microscopico caratterizzato dall'alternanza di fasi libere e fasi parassitarie. Morfologicamente la fase libera presenta una forma ovoidale con dorso convesso e lato ventrale concavo (Becker, 1977) e due flagelli, di cui uno ricorrente, e può essere individuato mediante microscopia ottica dal movimento tremolante a nuoto spirale che deriva dalla forma del corpo. Nella fase parassitaria la morfologia appare fortemente modificata, il protozoo assume forma allungata "a lacrima", immobile, ed i flagelli non sono più evidenti (Noga, 1996). *I. necator* può moltiplicarsi rapidamente mediante fissione binaria e nella fase immediatamente precedente alla divisione è facilmente identificabile dalla presenza di quattro flagelli.

I. necator è un ectoparassita obbligato di cute e branchie con un ciclo di vita diretto bifasico.

Segni clinici di malattia includono letargia, disorientamento, melanosi, difficoltà di movimento delle pinne ed arrossamento alla base della pinna dorsale.

La diagnosi su base microscopica è semplice, anche se bisogna aver cura di condurre l'esame parassitologico su soggetti deceduti da brevissimo tempo per evitare il distacco *post-mortem* del parassita. Le metodiche molecolari stanno diventando sempre più diffuse anche per la diagnosi della Ictiobodosi e, soprattutto, per l'identificazione dell'agente eziologico (Cunningham, 2002).

L'anestetico MS222, utilizzato anche per procedure di eutanasia, viene considerato un prodotto in grado di causare il distacco rapido di *I. necator* dopo 5 minuti di immersione. Questo ha suggerito che l'uso di MS222 potrebbe avere un grave impatto sulla valutazione clinica e diagnostica delle infezioni sostenute da questo parassita.

Per quanto concerne la terapia, in commercio esistono diversi prodotti chemioterapici efficaci nei confronti di *I. necator*, il cui uso non è però autorizzato in acquacoltura.

DIPLECTANUM AEQUANS

Phylum Platyhelminthes

Classe Monogenea

Ordine Monopisthocotylea

Famiglia Diplectanidae

Genere *Diplectanum*

Specie *D. aequans*

I parassiti appartenenti alla specie *Diplectanum aequans* sono monogenei caratterizzati da corpo allungato ed appiattito in senso dorso-ventrale, di lunghezza tra 300 µm e 2 mm, dotati posteriormente di un robusto organo d'attacco (*opisthaptor*) composto da due paia d'uncini (*hamuli*) uniti da due barre trasversali e coadiuvato da una struttura composta di piccole spine disposte ad impronta digitale (squamodisco). Nella porzione cefalica è presente una ventosa, due paia di macchie oculari e numerose ghiandole cefaliche. Si riproduce per ovoviparità e presenta un ciclo biologico diretto (Mölle Anders, 1986).

La diplectanosi colpisce soprattutto le spigole giovani con maggiore incidenza in primavera provocando un calo produttivo negli animali e, nei casi delle infestazioni massive, anche episodi di mortalità (Dezfuli et al 2007).

L'infezione causata dal *D. aequans* mostra che causa iperplasia, emorragie infiltrazione leucocitaria alle spigole. (infiltrazione attiva una risposta infiammatoria) Fish & Shellfish Immunology (2008) 24, 759e767

La diagnosi è essenzialmente microscopica, mediante osservazione di raschiati di muco branchiale o di porzioni dei filamenti branchiali.

La prevenzione della diplectanosi deve basarsi sulle condizioni di buone pratiche igieniche con vuoto sanitario delle vasche e pulizia del fondo.

I trattamenti di formalina anche ad alti dosaggi risultano inefficaci nei confronti delle forme giovanili e adulte (Giavenni, 1983; Silan & Maillard, 1986), che vengono invece devitalizzate dagli esteri fosforici. Cicli di trattamenti con formalina a 200-250 ppm per 60 minuti per 2 giorni consecutivi e ripetuti per 2-3 volte a giorni alterni possono comunque essere efficaci per ridurre drasticamente l'infezione. Si tratta comunque di prodotti non autorizzati per animali d'acquacoltura.

FURNESTINIA (LAMELLODISCUS) ECHENEIS

Phylum Platyhelminthes

Classe Monogenea

Ordine Monopisthocotylea

Famiglia Diplectanidae

Genere *Furnestinia*

Specie *F. echeneis*

Furnestinia echeneis è un parassita conosciuto in passato anche come *Dactylogyrus echeneis* (Wagener, 1857) e descritto come *Diplectanum echeneis* (Wagener, 1857) in *Sparus aurata* da Parona e Perugia nel 1889. Presenta un corpo di dimensioni ridotte (0,75-1mm di lunghezza), di forma cilindrica e leggermente assottigliato all'estremità anteriore. L'organo adesivo è costituito da un unico squamodisco costituito da 10 file concentriche di lamelle e provvisto posteriormente di due paia di grandi uncini marginali. (Bychowsky, 1957; Desdevises, 2001; Domingues e Boeger, 2008).

Questo monogeneo nell'ospite va a localizzarsi a livello branchiale. L'attacco degli uncini all'epitelio branchiale provoca una reazione iperplastica ed iperproduzione di muco, con conseguente perdita di funzionalità dell'epitelio respiratorio. La diagnosi avviene con l'esame microscopico di porzioni branchiali a piccolo ingrandimento evidenziando in particolare la struttura dell'opisthaptor e soprattutto gli organi riproduttivi maschili.

La profilassi viene svolta attraverso la frequente pulizia del fondo delle vasche e il vuoto sanitario con disinfezione con calce viva. Nelle gabbie le difficoltà sono maggiore e la prevenzione si basa sul mantenimento di una ridotta biomassa e sulla pulizia delle reti delle gabbie su cui a volte possono rimanere intrappolate le uova del parassita.

La terapia con bagni con formalina (125-250 ppm per 60-30 minuti per due giorni consecutivi ripetuti per due o tre settimane consecutive) si è dimostrata efficace in allevamenti con vasche a terra. (Van Ham e Hall, 1998). Tuttavia tutti gli usi di formalina sono stati recentemente banditi in molti paesi come quelli nell'Unione europea (Noga, 2010).

Altri farmaci come il praziquantel, utilizzato principalmente per gli animali terrestri ha un effetto spasmodico che danneggia il sistema neuromuscolare, inibendo l'attaccamento dei monogenei (Noga, 2010). Mebendazolo e il perossido sono relativamente molto meno efficienti o vitali (Noga, 2010; Sitjà-Bobadilla *et al.*, 2006).

SPARICOTYLE CHRYSOPHRII

Phylum Platyhelminthes

Classe Monogenea

Ordine Polyopisthocotylea

Famiglia Microcotlydae

Genere *Sparicotyle*

Specie *S. chrysophrii*

Sparicotyle chrysophrii è un trematode monogeneo che morfologicamente presenta un corpo allungato e appiattito in senso dorso-ventrale e con delle dimensioni 3,2-3,7x0,3-0,4 mm circa ed un robusto organo di attacco composto da numerose *clamps* (50 per lato) disposte in file parallele.

Il ciclo biologico è diretto: una volta emesse da parte dell'adulto, le uova si schiudono e lasciano fuoriuscire un oncomiracidio che si attaccherà ad un nuovo ospite o, nel caso fossero rimaste ancorate alle branchie, allo stesso ospite.

Tra i fattori che determinano l'infezione da *S. chrysophrii* la temperatura (Gonzalez-Lanza et al., 1991; Oliver 1982; Robertsen et al., 2008; Winger et al. 2008) rappresenta il più importante con maggiore incidenza tutto il periodo dell'anno con maggior prevalenza durante l'inverno.

L'azione patogena del parassita si esplica attraverso l'attacco all'epitelio branchiale tramite le *clamps*, in grado di determinare solitamente lesioni non gravi, ma che in presenza di un elevato numero di parassiti dotati inoltre di spiccata ematofagia, svolgono un'azione anemizzante proporzionale all'intensità d'infestazione. Per la diagnosi sono sufficienti l'osservazione allo stereomicroscopio mediante osservazione a fresco raschiando il primo arco branchiale perché è quello maggiormente contaminato rispetto agli altri archi (Oliver, 1984), mentre l'identificazione di specie viene effettuata mediante osservazione morfometrica delle *clamps* e delle spine dell'apertura genitale.

La terapia con formalina è in genere considerata efficace, anche se va ripetuta dopo 2-3 settimane in quanto le uova sono resistenti al trattamento. Altri trattamenti sperimentali si sono effettuati sia *in vitro* che *in vivo* con praziquantel, etanolo e perossido di idrogeno (Sitjà-Bobadilla et al., 2006). Si tratta comunque di prodotti non autorizzate per animali d'acquacoltura.

SANGUINICOLA SPP.

Phylum Platyhelminthes

Classe Trematoda

Ordine Digenea

Famiglia Sanguinicolidae

Genere *Sanguicola*,

Sanguicola von Graff, 1907 agente eziologico della sanguinicoliasi e un trematode digeneo di forma lanceolata lunga 1,5-2 mm e priva di ventose che allo stadio adulto si localizza a livello del sistema circolatorio.

Le uova vengono eliminate nel circolo sanguigno e vanno a localizzarsi in diversi organi interni (dove vengono incapsulati dalla reazione) o nelle branchie, dove schiude un miracidio che perfora l'epitelio e fuoriesce nell'acqua.

Si possono avere gravi lesioni branchiali, con emorragie e necrosi derivanti dall'occlusione dei vasi ad opera delle uova del parassita (Padrós *et al.*, 2001). I pesci si presentano letargici con un nuoto a spirale, smettono ad alimentarsi, presentano esoftalmo e nuoto superficiale.

Le uova di sanguinicolidi sono presenti nei vasi delle lamelle branchiali nel mese di Novembre e continuando ad accumularsi nei mesi successivi fino ad Aprile quando la temperatura dell'acqua è attorno ai 12-15°C.

Bagni con praziquantel si sono dimostrati efficaci nel controllo del parassita. Questo prodotto non è però autorizzato in acquacoltura.

CARDICOLA SP.

Phylum Platyhelminthes

Classe Trematoda

Ordine Digenea

Famiglia Aporocotylidae

Genere *Cardicola*

Alla famiglia Aporocotylidae appartengono trematodi digenei di forma lanceolata, lunghi 1,5-2 mm e privi di ventose che allo stadio adulto si localizzano a livello del sistema circolatorio e del rene.

Le uova, di forma pressoché triangolare, vengono eliminate in circolo e vanno a localizzarsi in diversi organi interni (dove vengono incapsulati dalla reazione) o nelle branchie, dove schiude un miracidio che perfora l'epitelio e fuoriesce nell'acqua. In tal caso si possono avere gravi lesioni branchiali, con emorragie e necrosi. Eventuali infezioni secondarie possono aggravare le lesioni e provocare mortalità.

Il miracidio dovrà trovare l'ospite intermedio, rappresentato da invertebrati bentonici, per trasformarsi in sporocisti e quindi in cercarie; queste ultime abbandoneranno il mollusco e penetreranno nell'ospite pesce dove diventeranno adulti.

Nell'orata è stata descritta recentemente la specie *Cardicola aurata* da Holtzer *et al.* (2008).

CERATOTHOA OESTROIDES

Phylum Athropoda

Classe Malacostraca

Ordine Isopoda

Famiglia: Cymothoidae

Genere *Ceratothoa*

Specie *Ceratothoa oestroides*

Il genere *Ceratothoa* ed in modo particolare la specie *C. oestroides* (Risso,1826) ha da adulto come sede definitiva la cavità orale dell'ospite. I membri di questa famiglia sono emafroditi proterandrici.

I pesci colpiti appaiono apatici e anoressici e possono presentare sintomi di insufficienza respiratoria. Inoltre causano atrofia della lingua, displasia dentaria e deformazione dei tessuti cartilaginei nella mandibola che assume una tipica forma "a sacchetto". Ovviamente la presenza di questi grossi parassiti in cavità orale interferisce con la normale attività alimentare causando uno stato di stress cronico, con conseguente ritardo della crescita e predisposizione ad altre infezioni batteriche e parassitarie (IFAS, University of Florida 2002).

CALIGUS MINIMUS

Phylum Arthropoda

Classe Crustacea

Ordine Copepoda

Famiglia Caligidae

Genere *Caligus*

Specie *C. minimus*

Caligus minimus, Otto 1821, è un crostaceo ectoparassita gli adulti mostrano di solito un dimorfismo sessuale: le femmine in genere sono più grandi dei maschi, e questi presentano appendici, in particolare le prime mascelle e le seconde antenne, che sono modificate per l'attacco durante la copulazione (Lester & Roubal, 1995).

Il ciclo biologico è diretto e prevede lo sviluppo in 5 fasi con 10 diversi stadi: nauplius (2 stadi), copepodite (1 stadio), chalimus (4 stadi), preadulto (1 stadio) e adulto (Kabata,1972).

I parassiti si localizzano nella testa, cavità buccale, palato, lingua e base dell'arco branchiale. I Pesci colpiti, mostrano iperproduzione di muco, emorragie nella bocca e sulla testa ed ulcere diffuse. I pesci presentano nuoto superficiale, letargia e cachessia. La lingua è severamente ulcerata ed è evidente anche macroscopicamente. Inoltre quando presenti in numero elevato a livello branchiale possono portare anche la morte dell'ospite per insufficienza respiratoria (Lin *et al.*, 1994, Wu *et al.*, 1997).

Il controllo di questa parassitosi si basa nel miglioramento della qualità dell'acqua, operando la pulizia periodica del fondo e l'aumento del ricambio idrico. Queste infezioni sono stati trattate con successo con organofosfati (Paperna 1975, Carvajal *et al.*, 1998; Sinnott, 1999; Ho & Nagasawa, 2001; Rae 2002), prodotti non autorizzati in acquacoltura.

Vengono qui di seguito presentate le caratteristiche principali dell'Anisakiasi ittica sostenuta da stadi larvali di nematodi Anisakidae del genere *Anisakis*.

ANISAKIASI

Numerose sono le zoonosi parassitarie di origine ittica descritte in tutto il mondo, prevalentemente in Estremo Oriente ed in paesi in via di sviluppo, ma in misura minore anche nei paesi "occidentali", compresa l'Europa. Queste sono causate dal consumo di alcuni prodotti della pesca, quali teleostei, cefalopodi, crostacei, molluschi gasteropodi e lamellibranchi, quando infestati da parassiti zoonotici (Deardorff e Overstreet, 1991; Chai et al., 2005). Gli animali acquatici rivestono, infatti, un ruolo di fondamentale importanza nel ciclo biologico dei parassiti eteroxeni, cioè con uno o più ospiti intermedi, che allo stadio adulto o larvale sono in grado di determinare patologia nell'uomo. L'uomo può comportarsi come ospite definitivo in patologie quali la Difillobotriasi/Plerocercosi sostenuta dal cestode *Diphyllobothrium latum*, la Heterofiasi, sostenuta dal trematode digeneo *Heterophyes heterophyes*, e la Opistorchiasi, indotta dal digeneo *Opistorchis* spp., oppure come ospite accidentale in patologie quali la Clinostomiasi e l'Anisakiasi.

Quest'ultima è sostenuta da parassiti appartenenti alla famiglia Anisakidae, del phylum Nematoda (Valinas et al., 2001), e rappresenta una zoonosi parassitaria di origine ittica oggetto, nel recente passato e nel presente, di frequenti ricerche volte a dare una risposta a punti non ancora chiariti del rapporto ospite-parassita, in un processo che coinvolge l'uomo come accidentale consumatore di prodotti ittici parassitati. Non è ancora completamente chiara la epidemiologia di questi parassiti marini, caratterizzati da un ciclo biologico complesso.

L'attenzione scientifica verso i nematodi Anisakidae, ed in particolare verso i due generi sicuramente zoonotici, *Anisakis* e *Pseudoterranova*, continua a rimanere elevata per diversi motivi:

-
- l'alto numero e l'aspecificità degli animali coinvolti nel ciclo biologico di questi parassiti;
 - la presenza costante di larve Anisakidae in alcuni dei teleostei più frequentemente pescati nei mari e negli oceani di tutto il mondo e durante tutto l'anno (seppure con incidenze diverse nelle diverse stagioni);
 - il crescente consumo di preparazioni a base di pesce crudo; la recente evidenza che, oltre alle forme invasive gastro-enteriche storicamente descritte, gli stadi larvali di *Anisakis* spp. sono in grado di causare reazioni allergiche di diversa gravità nel consumatore (Audicana e Kennedy, 2008).

Fra gli elementi che rendono necessari ulteriori studi è da annoverare la frammentarietà delle informazioni epidemiologiche sulla parassitosi negli ospiti acquatici e nei diversi areali marini, con carenti informazioni sulla reale distribuzione dei nematodi Anisakidae zoonosici nelle popolazioni ittiche selvatiche ed allevate in tutto il mondo (EFSA, 2010).

Per tale motivo l'EFSA nella "Scientific opinion on risk assessment of parasites in fishery products" emessa nel 2010 raccomanda la conduzione di ricerche coordinate volte a migliorare la sorveglianza e l'attenzione diagnostica nei confronti delle reazioni allergiche a parassiti ittici, conducendo parallelamente studi epidemiologici che possano definire con maggiore esattezza la correlazione tra anisakiasi ittica e patologia nell'uomo.

A tal proposito l'EFSA incoraggia fortemente le ricerche volte a valutare il "rischio *Anisakis*" in relazione ai prodotti della pesca (nessun areale di pesca viene ritenuto scevro di rischio) ed ai prodotti d'acquacoltura quando allevati in gabbia (solo per il salmone atlantico viene considerata sufficiente la documentazione scientifica attestante un rischio irrilevante d'infestazione da larve di *Anisakis* spp.), nonché gli studi utili ad individuare le possibili correlazioni esistenti tra esposizione al parassita ed incidenza/presentazione di sindromi allergiche.

Anisakiasi ittica

I pesci marini possono essere infestati da più di 300 specie di parassiti nematodi (Yamaguti, 1971), rappresentati da 17 famiglie di cui solo 5 specifiche per i pesci, mentre le altre appaiono condivise con vertebrati terrestri (Anderson, 1984).

Tali parassiti nematodi si possono riscontrare nell'ospite ittico incistati nel muscolo, nel fegato, sulla superficie dei visceri, all'interno della cavità corporea, nell'intestino o, più raramente, al di sotto del tegumento; altri siti includono il cuore, i vasi sanguigni, gli occhi e le gonadi. I nematodi sono, infatti, più mobili rispetto ad altri elminti ed anche per questo risultano in grado sia di provocare danni alla salute dei pesci che li ospitano, sia di influenzare il loro potenziale biotico: alcune sperimentazioni condotte su alici e merluzzi confermano un aumento della mortalità delle larve dei suddetti pesci quando parassitate (Dick e Choudhury, 1995; Balbuena *et al.*, 2000; Karlsbakk *et al.*, 2001).

I nematodi sono fra gli elminti parassiti di pesci su cui si focalizza una maggiore attenzione in quanto la loro presenza, talora facilmente evidenziabile, ha ripercussioni immediate sul piano economico (Hafsteinsson e Rizvi, 1987); fra questi, gli ascaridi marini della famiglia Anisakidae sono stati intensamente studiati e continuano ad essere al centro dell'attenzione di ricercatori del settore medico e veterinario per la capacità propria di alcune specie di infettare l'uomo: è il caso delle specie di *Anisakis (sensu lato)*, di *Pseudoterranova* (sin. *Phocanema* e *Terranova*) e di *Contracaecum (sensu lato)* (Ajmerito *et al.*, 1984; Panebianco e Lo Schiavo, 1984; Audicana e Kennedy, 2008).

Gli ascaridi sono ampiamente presenti nell'ambiente marino, in tutti i mari ed oceani; in particolar modo le larve di anisakidae sono diffuse in numerose specie di teleostei: questo ovunque vi siano uccelli piscivori e mammiferi marini, loro ospiti definitivi (Dick e Choudhury, 1995).

La tassonomia delle diverse specie di nematodi appartenenti alla famiglia Anisakidae, prima dell'avvento della genetica molecolare, era molto controversa in quanto si basava esclusivamente sul riconoscimento di determinati caratteri

morfologici. Quest'ultimi sono però applicabili solo agli esemplari adulti e spesso sono rilevanti solo negli individui di sesso maschile, rendendo difficile l'identificazione a livello di specie (Mattiucci e Nascetti, 2008). Per tale motivo gli stadi larvali possono essere diagnosticati solo a livello di genere e non di specie, mancando dei caratteri morfologici distintivi tipici dell'adulto.

Lo schema di classificazione per i membri della famiglia Anisakidae proposto da Hartwich (1974) si basava in gran parte sulle caratteristiche del sistema escretore e del tratto alimentare. Secondo questo autore, alla famiglia Anisakidae erano da riferire le tre sottofamiglie Anisakinae, Geozinae e Raphidascaridinae. Fagerholm (1991) invece divise gli anisakidi in due famiglie: Anisakidae e Raphidascarididae.

Attualmente viene ritenuta di maggiore validità la suddivisione della famiglia Anisakidae nella sottofamiglia Anisakinae, che comprende i generi *Anisakis*, *Pseudoterranova*, *Contraecum*, ecc., e nella sottofamiglia Raphidascarinae, che include *Hysterothylacium*, *Raphidascaris* ed altri generi.

Phylum: Nematoda

Classe: Secernentea

Ordine: Ascaridida

Famiglia: Anisakidae

Sottofamiglia: Anisakinae

Genere: *Anisakis*

Pseudoterranova

Contraecum

Phocascaris

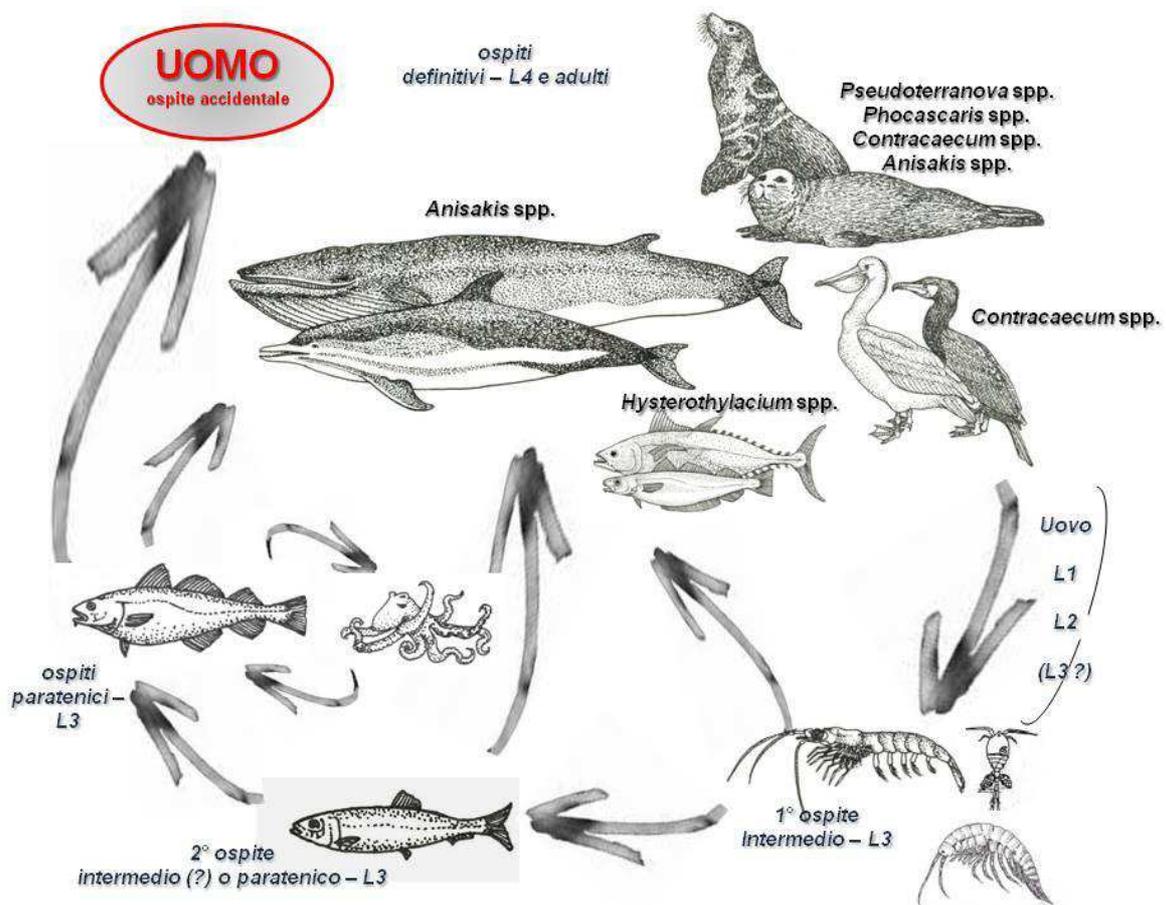
Sottofamiglia: Raphidascarinae

Genere: *Hysterothylacium*

Raphidascaris

Il ciclo biologico dei nematodi Anisakidae prevede una notevole differenziazione per quanto concerne gli ospiti definitivi dei diversi generi parassitari:

- il genere *Anisakis* ha come ospiti definitivi i cetacei;
- il genere *Pseudoterranova* ha come ospiti definitivi i pinnipedi;
- il genere *Contracaecum* ha come ospiti definitivi gli uccelli ittiofagi e, in misura minore, i pinnipedi.
- il genere *Phocascaris* ha come ospiti definitivi i pinnipedi;
- il genere *Hysterothylacium* (sin. *Thynnascaris*) ha come ospiti definitivi teleostei predatori.

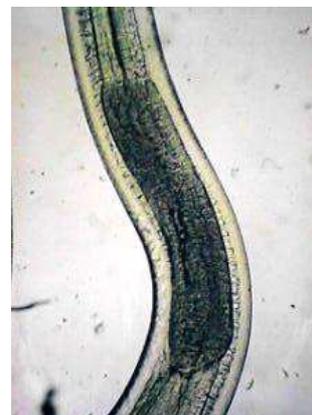


Rappresentazione schematica del ciclo biologico dei Nematodi Anisakidae

Anisakis, in senso lato, ha attratto la maggior attenzione dei ricercatori per la sua associazione con l'anisakiasi umana; la sua identificazione, infatti, assume particolare importanza nella diagnosi post-operatoria della malattia nell'uomo.

Le caratteristiche morfologiche di maggior rilievo sono le seguenti:

- La presenza di un ventricolo ben sviluppato;
- L'assenza di appendice ventricolare e cieco intestinale;
- La posizione del poro escretore, che si apre alla base delle labbra.

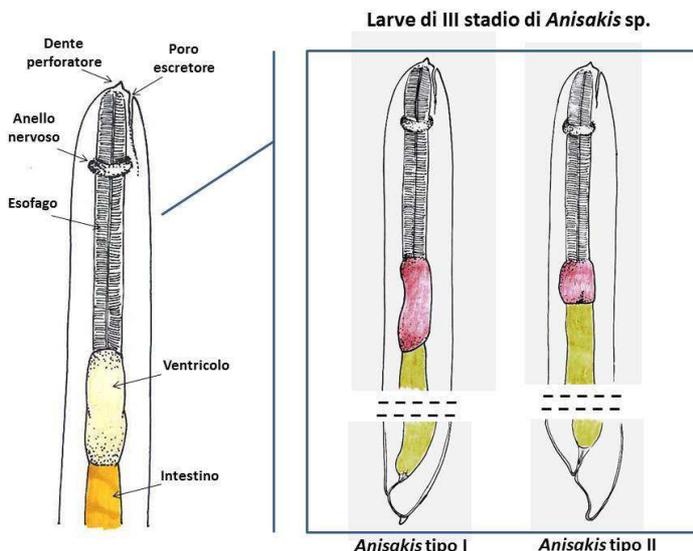


Berland (1961) e successivamente diversi autori giapponesi, hanno riconosciuto due principali tipologie morfologiche di larve di *Anisakis* spp.:

Tipo 1: più frequente, caratterizzato dalla presenza di un dente di perforazione ventrale prominente, coda corta con mucrone, esofago con lungo ventricolo che termina obliquamente al punto di giunzione con l'intestino.

Tipo 2: più raro del precedente, caratterizzato da lunga coda affusolata sprovvista di mucrone, ventricolo corto che si congiunge orizzontalmente con l'intestino e da un dente di perforazione prominente.

Inoltre Myers (1976) ha descritto una larva di Tipo 3, robusta, provvista di ventricolo breve e di coda corta con mucrone minutissimo che non risulta descritta successivamente da altri autori.



Rappresentazione schematica delle principali caratteristiche morfologiche delle larve di terzo stadio di *Anisakis* spp.

In seguito alla revisione di Davey (1971), al genere *Anisakis* risultavano appartenere solo tre specie valide: *A. simplex* (Rudolphi, 1809), *A. typica* (Diesing, 1860) e *A. physeteris* (Baylis, 1923). Inoltre, a causa della mancanza di dati sufficienti, Dailey (1971) considerò altre quattro specie come “*inquirendae*”: *A. dussumierii* (van Beneden, 1870), *A. schupakovi* Mozgovi, 1951, *A. alexandri* Hsu e Hoeppli, 1933 e *A. insignis* (Diesing, 1851).

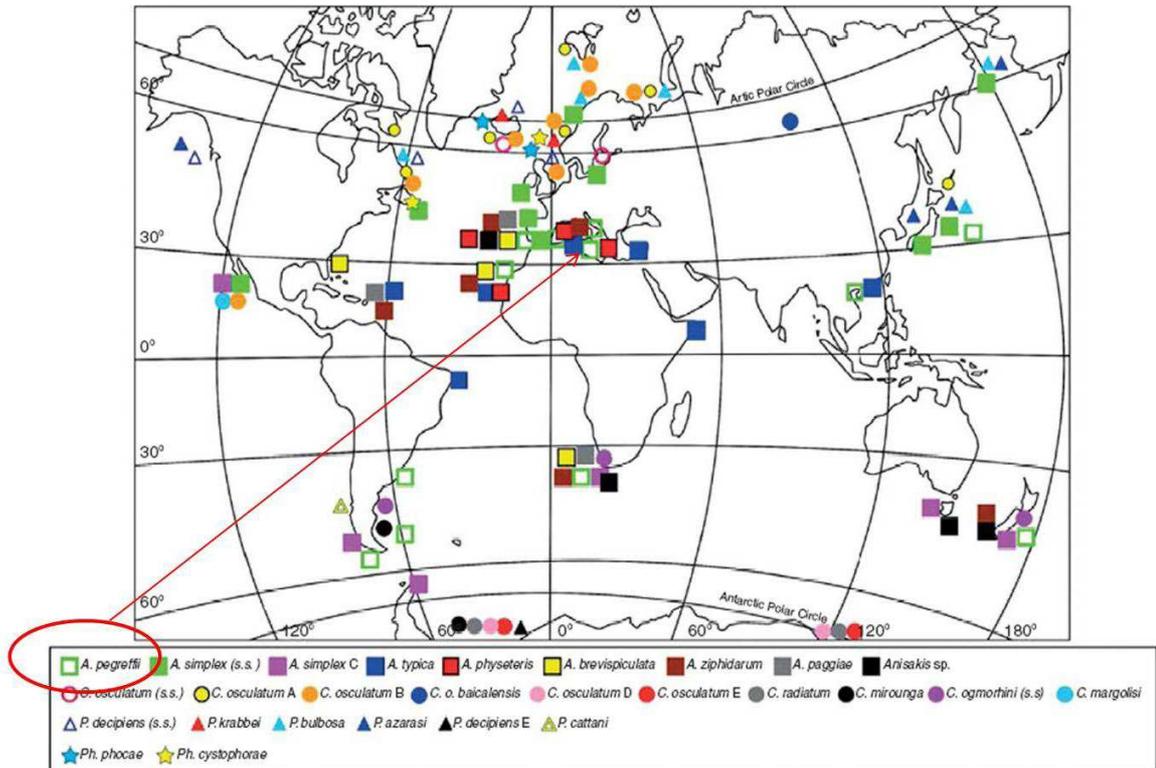
A distanza di alcuni decenni, Mattiucci *et al.* (2001) hanno rivisto completamente la revisione fatta da Davey (1971), che includeva solo tre specie nel genere *Anisakis*, sulla base dei risultati di nuove tecniche diagnostiche quali l’analisi elettroforetica multilocus (MAE) e l’analisi della struttura genetica applicate sia agli adulti che alle larve della specie *Anisakis*.

In particolare, l’analisi degli allozimi e delle sequenze di DNA mitocondriale citocromo ossidasi 2 (mtDNA *cox2*) di tutte le specie caratterizzate geneticamente hanno messo in evidenza l’esistenza di due *clade* all’interno del genere *Anisakis* (Mattiucci e Nascetti, 2006, 2008; Mattiucci *et al.*, 2005; Valentini *et al.*, 2006).

Nel *clade* I risultano incluse sei specie: tre specie facenti parte di *A. simplex complex* [*A. simplex* (s.s.), *A. pegreffii* e *A. simplex* C], *A. typica*, *A. ziphidarum* e *A. nascettii* (Mattiucci *et al.*, 2009; Karl *et al.*, 2011). La forma larvale di tutte le specie comprese nel *clade* I è ricondotta ad *Anisakis* tipo I (*sensu* Berland, 1961).

Nel *clade* II invece sono incluse le specie *A. physeteris*, *A. brevispiculata* e *A. paggiae*, che rappresentano un complesso di specie gemelle (*sibling species*) riconoscibili geneticamente sia a livello nucleare che mitocondriale.

La morfologia degli stadi larvali delle tre specie comprese nel clade II è riferibile ad *Anisakis* tipo II (*sensu* Berland, 1961).



Distribuzione geografica delle diverse specie di nematodi Anisakidae (Mattiucci e Nascetti, 2008).

Come già accennato in precedenza, i nematodi Anisakidae comprendono specie con cicli biologici dipendenti da più ospiti; questi si servono infatti di vari invertebrati come primi ospiti intermedi (crostacei bentonici, quali anfipodi, decapodi ed eufasidi, e crostacei planctonici, ad esempio i copepodi) oltre che di crostacei, di molluschi cefalopodi e di pesci (in particolare clupeidi, gadidi, sparidi, lofidi e sgomberidi) come secondi ospiti intermedi o paratenici (Smith, 1983; Koie 1993, 2001). Il tasso di infestazione di tali pesci teleostei marini riflette sia le condizioni idrogeografiche locali, sia le diverse aggregazioni dei

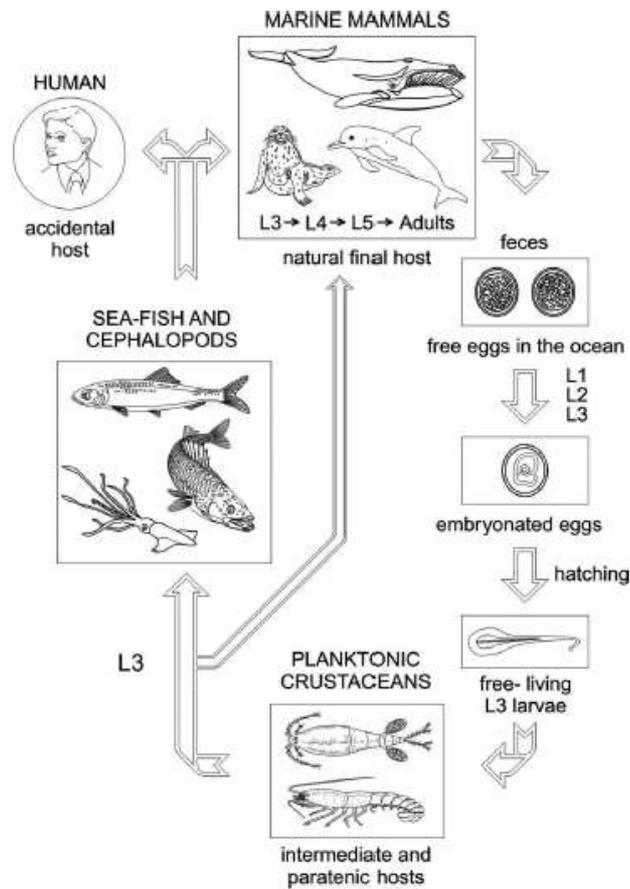
potenziali ospiti intermedi, sia il momento in cui questi ultimi si inseriscono nel ciclo biologico del parassita (Klimpel *et al.*, 2004).

Una delle motivazioni per le quali ancora oggi l'attenzione si focalizza sui nematodi del genere *Anisakis* è legata, oltre al suo elevato potenziale zoonosico, alla varietà delle specie e al numero elevato di animali coinvolti nel suo ciclo biologico, favorito anche da leggi protezionistiche nei confronti dei mammiferi marini, quali balene, delfini e foche, in vigore in molti Paesi. *Anisakis* è stato segnalato come parassita di oltre 200 specie di pesci, 25 specie di molluschi cefalopodi e oltre 50 specie di mammiferi in tutto il mondo; eppure, nonostante la sua vasta diffusione alcuni aspetti del suo ciclo biologico, assai complesso, sono ancora poco conosciuti e controversi (Abollo *et al.*, 2001; Iglesias *et al.*, 2001; Ugland *et al.*, 2004; Klimpel *et al.*, 2004).

I nematodi del genere *Anisakis* devono andare incontro allo sviluppo di quattro stadi larvali prima del raggiungimento dello stadio adulto. Le femmine adulte, dopo essere state fecondate dai maschi, rilasciano le uova nel lume gastro-enterico dei loro ospiti definitivi. Le uova vengono emesse con le feci in mare e richiedono un periodo di sviluppo embrionale intra-ovarico prima della schiusa della larva. Poiché Køie (1993), Køie e Fagerholm (1993) e Køie *et al.* (1995) hanno riscontrato la presenza di due cuticole intorno alla larva prima della schiusa, si suppone che all'interno dell'uovo si verificano due mute e che schiuda quindi una larva di terzo stadio.

Queste larve sono molto attive e attraverso movimenti ondulatori attirano l'attenzione dei primi ospiti intermedi, rappresentati da crostacei quali euphausiacei, copepodi, decapodi e anfipodi, nei quali, dopo essere stati ingeriti, migrano a livello dell'emocele dove si accrescono e raggiungono il terzo stadio "infettante".

I crostacei Euphausiidi (principali componenti del krill) sembrano essere i più importanti ospiti intermedi nel ciclo di vita della specie *Anisakis* e sono stati proposti anche come principali vettori biologici per gli ospiti ittici (Højgaard, 1999).



Rappresentazione schematica del ciclo biologico di *Anisakis simplex*
(Audicana e Kennedy, 2008)

Pesci e molluschi cefalopodi, secondi ospiti intermedi\paratenici, si infettano mangiando crostacei bentonici o planctonici all'interno dei quali è presente il terzo stadio larvale. Le larve riescono ad attraversare la parete del tratto digerente e si portano all'interno della cavità corporea dove si incistano a livello delle sierose viscerali (Anderson, 2000). Le larve inoltre possono, anche se meno frequentemente, migrare ed andare ad incistarsi nel tessuto muscolare sia intra-vitam che post-mortem.

I principali pesci ospiti sono specie ittiche totalmente o parzialmente planctofaghe come l'aringa (*Clupea harengus*), l'alice (*Engraulis encrasicolus*), la sardina (*Sardina pilchardus*), lo sgombro (*Scomber scombrus*), il merluzzo

(*Gadus morhua*), in grado di acquisire il parassita direttamente dai crostacei ospiti intermedi (Abollo *et al.*, 2001; McClelland e Martell, 2001). Pesci predatori come barracuda (*Sphyraena barracuda*), rana pescatrice (*Lophius americanus*), grongo (*Conger conger*) e pesce sciabola (*Lepidopus caudatus*) sono invece ospiti paratenici (ossia ospiti in cui il parassita non subisce alcuno sviluppo biologico in attesa di essere assunto dall'ospite definitivo) che acquisiscono il parassita nutrendosi dei pesci planctofagi infetti (Laffon-Leal *et al.*, 2000; Abollo *et al.*, 2001; McClelland e Martell, 2001).

Infatti quando piccoli pesci infetti vengono predati da pesci piscivori più grandi, in seguito ai processi digestivi la larva viene excistata e risulta essere in grado di reinfettare il nuovo ospite, migrando nella cavità corporea ed andando a re-incistarsi a livello delle sierose viscerali.

Questo è molto importante dal punto di vista epidemiologico, perché il ripetuto trasferimento orizzontale di larve tra pesci attraverso la naturale catena alimentare permette l'accumulo di enormi quantità di larve, soprattutto nei pesci di età e di dimensioni maggiori i quali, a volte, possono addirittura arrivare ad ospitare centinaia o migliaia di larve incapsulate (Smith e Wooten, 1978). Sembra esistere infatti una correlazione positiva tra età, taglia del pesce e prevalenza/intensità/abbondanza di larve anisakidi presenti al suo interno.

Recentemente alcuni studi hanno dimostrato elevati livelli di infestazione da larve di *Anisakis simplex* s.s. in spigole (*Dicentrarchus labrax*) pescate in areali dell'Oceano Atlantico nord-orientale (Bernardi, 2009; Bernardi *et al.*, 2011).

Il ciclo si conclude quando l'ospite definitivo si infetta mangiando crostacei, pesci o cefalopodi contenenti le larve. A questo punto le larve di terzo stadio subiscono altre due mute successive all'interno del canale alimentare, passando da larva di quarto stadio ad individuo adulto e raggiungendo la maturità sessuale.

L'uomo si inserisce nel ciclo come ospite accidentale e si infesta in seguito al consumo di pesci o cefalopodi contenenti il terzo stadio larvale assunti crudi o poco cotti. Le larve non completano il loro sviluppo nell'ospite accidentale, venendo inattivate in genere entro poche ore o pochi giorni, ma possono

penetrare la mucosa gastrica o intestinale causando una serie di effetti patologici di diversi grado e natura.

Infestazioni da *Anisakis* spp. in specie ittiche allevate

Come già accennato in precedenza, numerose specie ittiche d'interesse commerciale sono state descritte quali ospiti intermedi o paratenici di *Anisakis* spp., rappresentando quindi un potenziale rischio per il consumatore.

Le segnalazioni sono però riferite prevalentemente a soggetti selvatici provenienti da ambienti di pesca marini ed oceanici dove essi rientrano necessariamente nelle catene trofiche sopra descritte e possono quindi assumere le larve di *Anisakis* spp. attraverso l'ingestione di prede parassitate (crostacei e/o pesci e cefalopodi).

Per quanto riguarda le specie ittiche d'allevamento, l'EFSA (2010) ritiene ancora insufficienti i dati epidemiologici relativi al "rischio *Anisakis*", che potrebbe sussistere soprattutto in ambienti produttivi in gabbia dove esistono condizioni ambientali e gestionali teoricamente permissive per l'infestazione dei pesci allevati da parte di larve di nematodi Anisakidae zoonosici. A tal proposito, solo per il salmone atlantico sarebbero da considerare sufficienti i lavori scientifici attestanti un rischio irrilevante d'infestazione da larve di *Anisakis* spp. (Angot e Brasseur, 1993; Lunestad, 2003;).

Possono fare eccezione quelle specie ittiche per cui ancora si ricorre alla somministrazione di pesce/scarti di pesce per l'alimentazione. A tal proposito può essere citato il recente lavoro di Shih *et al.* (2010), che hanno reperito *Anisakis simplex* in soggetti di cobia (*Rachycentron canadum*) allevati in gabbia a Taiwan ma quale conseguenza della pratica di somministrare pesce fresco (non congelato) nelle ultime fasi di allevamento.

Similmente, anche il tonno rosso sottoposto a fasi di ingrasso in gabbia è stato trovato positivo per *Anisakis* spp. all'esame parassitologico (Mladineo *et al.*, 2008), e ciò potrebbe essere conseguenza, anche in questo caso, della somministrazione ai fini alimentari di pesce non congelato ma anche dell'origine

selvatica dei soggetti sottoposti ad allevamento, che potrebbero quindi albergare le larve del parassita già al momento della loro immissione in gabbia.

Per quanto concerne le specie ittiche marine oggetto d'allevamento in gabbia nel Mediterraneo, ed in particolare spigole ed orate, esistono pochi dati scientifici che attestino l'assenza di larve di *Anisakis* spp., ad eccezione di una recente pubblicazione di Peñalver *et al.* (2010) che hanno esaminato 612 orate e 259 spigole provenienti da diversi allevamenti siti nella regione di Murcia, Spagna, nel Mediterraneo occidentale, senza riscontrare alcuna larva di *Anisakis* spp.

Se da un lato l'orata sembra essere un ospite poco suscettibile alle infestazioni da larve Anisakidae, come dimostrato dall'assenza di segnalazioni anche in esemplari selvatici (Mattiucci S., com. pers.), la spigola potrebbe essere un ospite paratenico particolarmente efficace, anche a causa della sua attitudine trofica fortemente predatrice sia su invertebrati (allo stadio giovanile) sia su altri pesci (allo stadio adulto). Ciò è dimostrato dai risultati delle ricerche di Bernardi (2009) e Bernardi *et al.* (2011) che hanno evidenziato alte prevalenze ed elevate intensità d'infestazione in spigole selvatiche pescate in areali dell'Atlantico nord-orientale (Zona FAO 27).

Va comunque evidenziato come le spigole e le orate allevate in gabbia nel Mediterraneo vengano alimentate con mangime commerciale e rappresentino gli stadi di crescita di avannotti che provengono da avannotterie industriali, dove risulta impossibile contrarre l'infestazione da larve di nematodi Anisakidae.

Similmente al salmone atlantico, spigole ed orate andranno quindi monitorati attentamente in ambiente d'allevamento in gabbia al fine di produrre dati epidemiologici esaustivi che possano indicare come inequivocabilmente minimo, se non nullo, il "rischio *Anisakis*".

Parte di questa tesi ha avuto quale scopo primario quello di produrre evidenza dell'assenza di larve di nematodi del genere *Anisakis* in spigole ed orate allevate in gabbia in Italia ed in Grecia.

MATERIALI E METODI

Da novembre 2008 a dicembre 2010 si sono condotte ricerche volte ad approfondire le conoscenze sulla parassitofauna dei pesci marini allevati in Grecia ed in Italia, con riferimento specifico agli ectoparassiti, prendendo in considerazione differenti tipologie produttive e diverse categorie di taglia.

Sulle spigole e sulle orate allevate in gabbia si è inoltre proceduto a condurre esami parassitologici mirati all'individuazione dell'eventuale presenza di stadi larvali di nematodi Anisakidae zoonosici.

La programmazione dell'attività di ricerca si è articolata in tre filoni principali:

- 1) studi sui dati quantitativi (prevalenza ed intensità) inerenti alle più frequenti ectoparassitosi delle spigole e orate allevate con diversi sistemi d'allevamento;
- 2) valutazione dei danni tessutali correlabili alla presenza dei parassiti;
- 3) ricerca di potenziali agenti di zoonosi parassitarie di origine ittica (*Anisakis*).

Le principali attività svolte sono state le seguenti:

- a) ricerca bibliografica e relativa definizione delle modalità di raccolta ed archiviazione;
- b) utilizzo di protocolli e procedure operative standard per l'esecuzione delle diverse attività analitiche (esame necroscopico, esame parassitologico, tecniche di identificazione dei parassiti su base morfologica ed esame istologico);
- c) pianificazione delle attività di campionamento (individuazione delle diverse tipologie d'allevamento e delle specie ittiche da sottoporre ad indagine, definizione di piani di campionamento);
- d) esecuzione dei campionamenti, effettuazione delle analisi necroscopiche, parassitologiche ed istologiche;
- e) valutazione dei risultati (elaborazione dei dati, considerazioni epidemiologiche e patologiche).

Le attività sono state svolte primariamente presso il Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie dell'Università di Bologna, nel rispetto della norma ISO 9001:2000, ed in parte presso l'Hellenic Centre for Marine Research (HCMR),

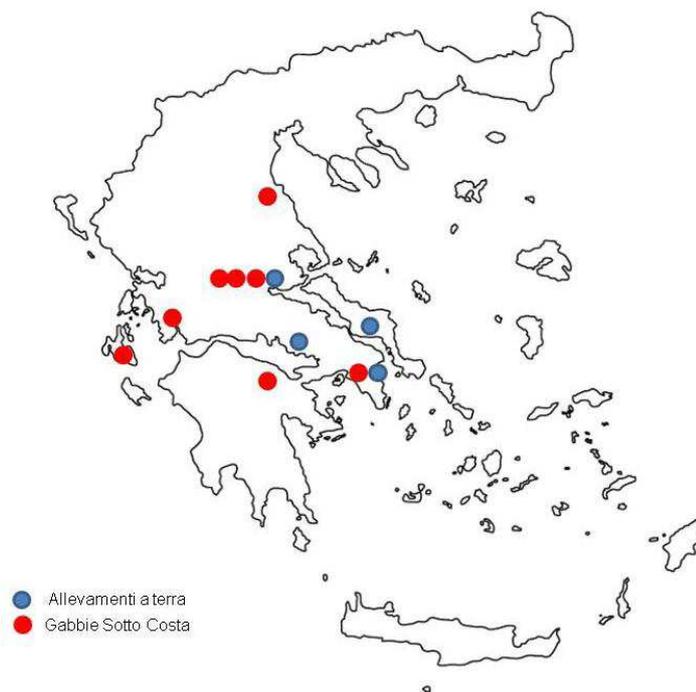
Institute of Aquaculture, Laboratory of Fish Nutrition and Pathology Agios Kosmas di Atene, sotto la supervisione del Dr. George Rigos.

I pesci venivano trasportati in laboratorio, all'interno di contenitori refrigerati, in buste di plastica che impedissero il contatto diretto della superficie cutanea con il materiale refrigerante o comunque con materiali che potessero danneggiare il campione e/o causare il distacco e la dispersione dei parassiti eventualmente presenti, facendo in modo che intercorresse un intervallo di tempo più breve possibile dal momento del prelievo. Nel caso il campione pervenisse da località molto distanti, si ricorreva all'utilizzo di spedizioni tramite corriere espresso che potessero garantire la consegna entro 24 ore.

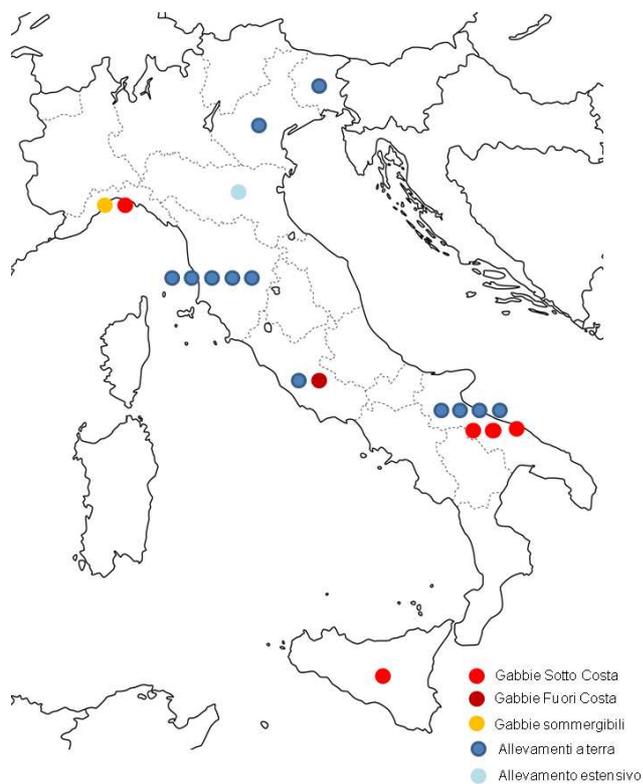
Su tutti i soggetti sono stati condotti esami necroscopici e parassitologici secondo Protocolli Operativi adottati presso il Laboratorio di Ittiopatologia del Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie (Vedi Allegato 1 e Allegato 2) con particolare riferimento alla parte inerente alla ricerca ed alla identificazione di ectoparassiti a livello cutaneo e branchiale.

Inoltre al fine di poter valutare il ruolo delle patologie parassitarie nell'ambito dei fattori limitanti le attività produttive in maricoltura e quindi delineare gli opportuni piani di prevenzione, si è deciso di indagare gli effetti patogeni dei parassiti nelle diverse specie ittiche marine allevate in differenti sistemi d'allevamento mediante la conduzione di studi istopatologici sull'ospite (vedi Allegato 3). A questo scopo porzioni di organo parassitate sono state fissate in formalina tamponata al 10% e processate, procedendo poi all'osservazione dei preparati istologici con valutazione delle lesioni tissutali in considerazione dell'intensità d'infestazione rilevata.

Sono stati presi in considerazione un totale di 32 allevamenti: 12 situati in Grecia, di cui 4 a terra (T) e 8 in gabbia galleggiante sotto costa (GSC) e 20 in Italia, di cui 1 estensivo (E), 11 a terra, 6 in gabbia galleggiante sotto costa, 1 in gabbia galleggiante fuori costa (GFC) e 1 in gabbia sommergibile (GS).



Allevamenti campionati in Grecia



Allevamenti campionati in Italia

Dagli allevamenti campionati sono stati prelevati ed esaminati in totale 1378 pesci, di cui 916 spigole e 462 orate, come si evince dalla tabella seguente.

	Grecia			Italia			Totale
	Terra	Gabbia	Totale	Terra	Gabbia	Totale	
Orata	48	96	144	229	89	318	462
Spigola	26	80	106	449	361	810	916
Totale	74	176	250	678	450	1128	1378

Pesci esaminati nel corso dell'indagine svolta in Grecia e in Italia

Nel corso dello studio non sono state prese in considerazione le fasi larvali e post-larvali provenienti dalle avannotterie.

In particolare 475 spigole (26 dalla Grecia e 449 dall'Italia) e 277 orate (48 dalla Grecia e 229 dall'Italia) provenivano da allevamenti a terra, mentre 441 spigole (80 dalla Grecia e 361 dall'Italia) e 185 orate (96 dalla Grecia e 89 dall'Italia) da allevamenti in gabbia.

Nella tabella seguente viene presentato in dettaglio il numero di pesci campionati per ogni tipologia di allevamento.

	Estensivo		Intensivo								Totale	
	G	I	T		GSC		GFC		GS		G	I
			G	I	G	I	G	I	G	I		
Orata	-	-	48	229	96	66	-	23	-	-	144	318
Spigola	-	10	26	439	80	295	-	56	-	10	106	810
Totale	-	10	74	668	176	361	-	79	-	10	250	1128

Numero di spigole e orate esaminate in base al tipo di allevamento

Per quanto riguarda la distinzione in base alla taglia, si è preso in considerazione solo il peso, considerato il parametro più indicativo.

Sono state stabilite 3 classi di taglia:

soggetti di peso <10g

soggetti di peso compreso tra 10g e 100g

soggetti di peso >100g

Nelle tabelle seguenti vengono indicati i pesci esaminati nell'ambito delle tre categorie di taglia rispettivamente in base alla specie ittica, alla nazione di provenienza e alla tipologia di allevamento.

	Spigola	Orata	Totale
<10g	247	285	532
10-100g	450	73	523
>100g	219	104	323
Totale	916	462	1378

Numero di spigole e orate esaminate in base alle tre classi di taglia

	Grecia	Italia	Totale
<10g	69	463	532
10-100g	67	456	523
>100g	114	209	323
Totale	250	1128	1378

Numero di pesci esaminati in Grecia ed Italia in base alle tre classi di taglia

	A terra	Gabbia	Totale
<10g	338	194	532
10-100g	222	301	523
>100g	192	131	323
Totale	752	626	1378

Numero di pesci esaminati da allevamenti a terra e in gabbia in base alle tre classi di taglia.

Per quanto concerne l'intensità d'infezione (N. parassiti/ospite) sono state individuate diverse classi a seconda dell'agente parassitario considerato:

- *Amyloodinium ocellatum*: + = 1-2 trofonti/filamento branchiale; ++ = 2-50; +++ = 50-100; ++++ = >100;
- *Diplectanum aequans*: + = 1-20 parassiti / arco branchiale; ++ = 20-50; +++ = 50-200; ++++ = >200;

-
- *Sparicotyle chrysophrii*: + = 1-5 parassiti / arco branchiale; ++ = 5-10; +++ = >10;
 - *Furnestinia echeneis*: + = 1-5 parassiti / arco branchiale; ++ = 5-20; +++ = >20.

Per quanto riguarda il calcolo dei dati quantitativi di infestazione, quali prevalenza (P) ed intensità (I) ci siamo riferiti al lavoro svolto da Bush *et al.* (1997).

Tutte le spigole e le orate provenienti da allevamenti in gabbia sono stati sottoposti anche alla ricerca di nematodi appartenenti al genere *Anisakis* mediante esame parassitologico degli organi viscerali e mediante sfilettatura del muscolo laterale.

La modalità di esecuzione della ricerca delle larve di nematodi Anisakidae è stata così eseguita: dopo un primo attento esame visivo della superficie esterna, si è proceduto all'apertura della cavità addominale, come da Protocollo Operativo (vedi Allegato 1) con esame visivo immediato della stessa. Per ogni soggetto si procedeva poi all'asportazione del pacchetto viscerale, subito posto in capsula petri e ricoperto con soluzione fisiologica (0,85% NaCl). L'accurato esame visivo del pacchetto viscerale veniva condotto dopo circa 10 minuti, in modo tale che le larve anisakidi potessero divenire più facilmente rilevabili dopo loro mobilitazione in soluzione fisiologica. Si procedeva a visionare accuratamente stomaco, intestino, mesentero, gonadi, vescica natatoria (quando presente), milza e fegato.



Eviscerazione ed esposizione della cavità peritoneale in spigola e orata

Quindi veniva effettuato un attento esame visivo della superficie peritoneale e da ultimo le masse muscolari venivano sfilettate, osservate visivamente e quindi sezionate in porzioni di circa 3 mm di spessore, così da poter essere sottoposte a transilluminazione (esame visivo con l'aiuto di una fonte luminosa per la ricerca delle larve eventualmente incistate nel tessuto muscolare).

Particolare attenzione è stata riservata alle porzioni marginali dei filetti in esame (alette ventrali), alla parte, cioè, che forma le pareti della cavità addominale ed è, quindi, a stretto contatto con il pacchetto viscerale del pesce.



Porzioni di muscolo laterale di spigola preparate per l'esame visivo volto alla ricerca di larve di *Anisakis* spp. (a destra: transilluminatore).

Si è proceduto inoltre ad esaminare con lo stesso metodo 30 soggetti di spigola e 30 di orata provenienti dall'ambiente selvatico e pescati mediante lenza nel Mar Ionio nella zona antistante la laguna di Missolongi.



Veduta della Laguna di Missolongi. Grecia

Data	Specie ittica	Peso	Lunghezza
1.11.2011	Spigola	387g	34cm
		240g	30cm
		350g	32cm
18.12.2011	Spigola	240g	30cm
		350g	32cm
		300g	30cm
		300g	30cm
		280g	28cm
		380g	34cm
		350g	32cm
		350g	32cm
		350g	32cm
21.01.2012	Spigola	350g	32cm
		350g	32cm
		250g	30cm
		250g	32cm
		290g	30cm
		300g	30cm
		300g	30cm
		350g	32cm
		370g	34cm
		370g	34cm

Spigole selvatiche esaminate per la ricerca di larve di *Anisakis* spp.

Data	Specie ittica	Peso	Lunghezza
2.11.2011	Orata	235g	25cm
		240g	25cm
		250g	27cm
		235g	25cm
		260g	28cm
		250g	27cm
		235g	25cm
		240g	25cm
		250g	25cm
		235g	25cm
19.12.2011	Orata	250g	26cm
		250g	26cm
		200g	22cm
		200g	22cm
		200g	22cm
		240g	25cm
		235g	25cm
		235g	25cm
		250g	27cm
		250g	27cm
22.01.2012	Orata	220g	23cm
		220g	23cm
		220g	23cm
		240g	25cm
		235g	25cm
		235g	25cm
		240g	25cm
		250g	27cm
		250g	27cm
		250g	27cm

Orate selvatiche esaminate per la ricerca di larve di *Anisakis* spp.

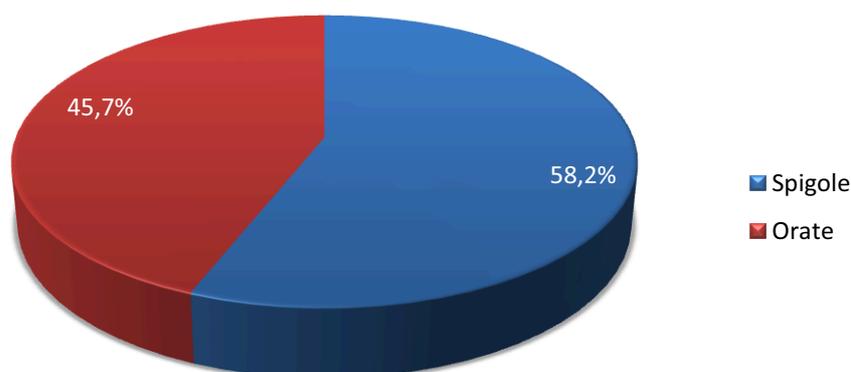
RISULTATI E DISCUSSIONE RELATIVI AD ECTOPARASSITI DI SPIGOLA ED ORATA

Per una più facile lettura dei risultati ottenuti, si provvederà a presentare per ogni specie ittica dapprima i risultati generali delle attività di monitoraggio parassitologico, quindi una scheda dei reperti parassitari di maggior interesse con l'analisi descrittiva dei risultati e con le osservazioni relative agli effetti patogeni sull'ospite.

Di tutti i 1378 pesci esaminati sono risultati positivi per la presenza di ectoparassiti 744 (54%) soggetti, di cui 533 (58,2%) spigole e 211 (45,7%) orate, come si evince dalle tabelle e dai grafici seguenti.

	N esaminati	N positivi	Prevalenza (%)
Spigole	916	533	58,2
Orate	462	211	45,7
Totale	1378	744	54,0

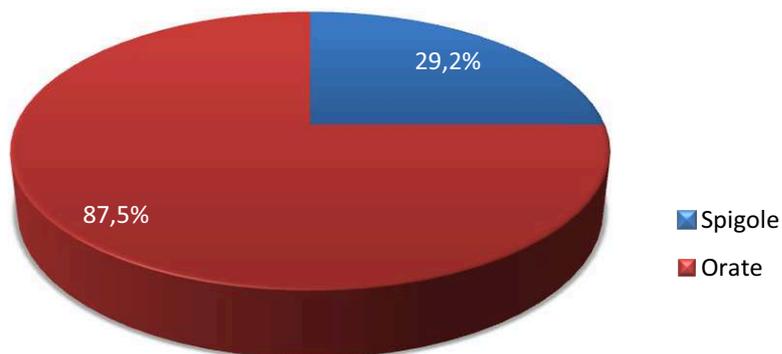
Pesci positivi per ectoparassiti distinti in base alla specie ittica



Pesci positivi per ectoparassiti suddivisi in base alla specie ittica

Grecia	N esaminati	N positivi	Prevalenza (%)
Spigole	106	31	29,2
Orate	144	126	87,5
Totale	250	157	62,8

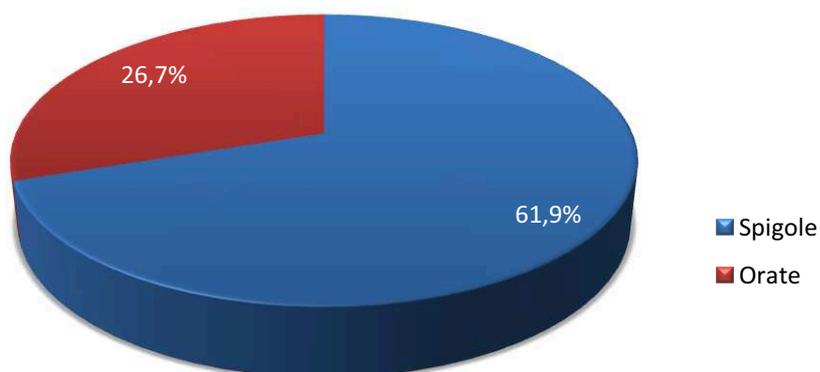
Grecia: numero pesci positivi per ectoparassiti in base alla specie ittica



Grecia: pesci positivi per ectoparassiti in base alla specie ittica

Italia	N esaminati	N positivi	Prevalenza (%)
Spigole	810	502	61,9
Orate	318	85	26,7
Totale	1128	587	52

Italia: numero pesci positivi per ectoparassiti in base alla specie ittica



Italia: pesci positivi per ectoparassiti in base alla specie ittica

Per quanto riguarda le percentuali di positività per ectoparassiti nei pesci esaminati, nelle tabelle seguenti vengono riportati i valori in base ai principali sistemi di allevamento (terra/gabbia) e in base alle categorie di taglia esaminate

	N. esaminati	N positivi	Prevalenza (%)
Terra	782	316	40,4
Gabbia	596	428	71,8

Pesci positivi per ectoparassiti distinti in base al sistema d'allevamento

	N. esaminati	N positivi	Prevalenza (%)
<10g	510	138	27,1
10-100g	523	371	70,9
10-100g	323	235	72,7

Pesci positivi per ectoparassiti distinti in base alle tre classi di taglia

Il confronto tra i sistemi di allevamento ha evidenziato valori di positività per ectoparassiti più elevati nei sistemi in gabbia, dato che sorprende in quanto i problemi di ricambio idrico, pulizia del fondo e tutti gli altri fattori abiotici che influenzano la colonizzazione del sistema da parte di una specie ectoparassitaria, sono solitamente più accentuati nei sistemi a terra. Probabilmente nei sistemi di allevamento in gabbia vengono utilizzate biomasse molto più elevate che condizionano la presenza di questi parassiti.

Per quanto riguarda le classi di taglia, i minori valori di prevalenza riscontrati nei soggetti di taglia <10g, nonostante i pesci giovani siano immunologicamente meno competenti nei confronti degli ectoparassiti, si possono spiegare con il maggiore tempo di esposizione dei soggetti di taglia maggiore alla "colonizzazione" da parte degli ectoparassiti stessi, che nel complesso aumenta la probabilità che ospite e parassita vengano in contatto.

SPIGOLA

Dicentrarchus labrax



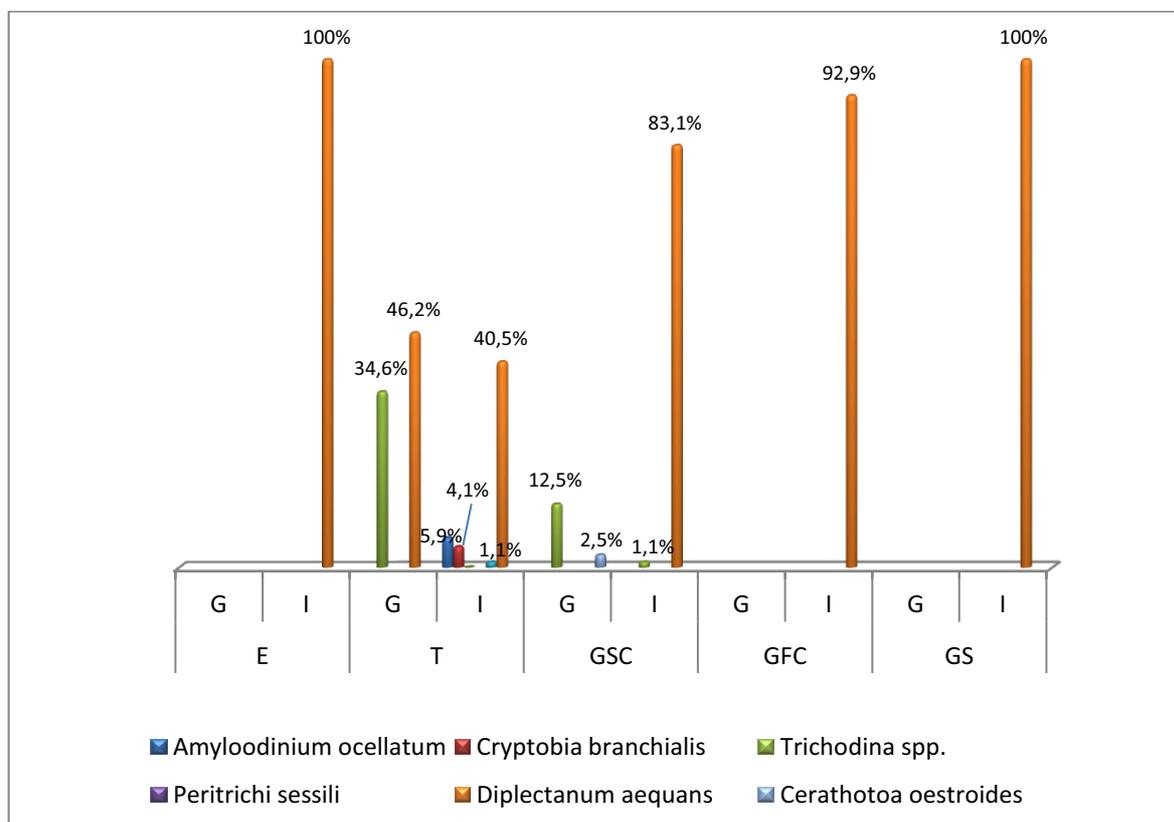
La presenza di ectoparassiti è stata riscontrata in 533 (50,2%) dei 916 soggetti esaminati.

Nella tabella seguente vengono riportate le specie parassitarie riscontrate nel corso dell'indagine, indicando il numero di soggetti positivi e le percentuali di positività osservate in relazione alla tipologia d'allevamento.

Spigola N. positivi (%)	E		T		GSC		GFC		GS	
	G	I	G	I	G	I	G	I	G	I
<i>Amyloodinium ocellatum</i>	0	0	0	26 5,9%	0	0	0	0	0	0
<i>Cryptobia branchialis</i>	0	0	0	18 4,1%	0	0	0	0	0	0
<i>Trichodina</i> spp.	0	0	9 34,6%	55 12,5%	10 12,5%	4 1,1%	0	0	0	0
Peritrichi sessili	0	0	0	5 1,1%	0	0	0	0	0	0
<i>Diplectanum aequans</i>	0	10 100%	12 46,2%	178 40,5%	0	245 83,1%	0	52 92,9%	0	10 100%
<i>Ceratothoa oestroides</i>	0	0	0	0	2 2,5%	0	0	0		

Specie di ectoparassiti riscontrate nelle spigole esaminate in Grecia (G) ed in Italia (I): numero di soggetti positivi e percentuali di positività per tipologia d'allevamento

Nel grafico seguente vengono schematizzate le percentuali di positività complessive osservate nella spigola per le diverse specie parassitarie reperite.



Positività delle diverse specie di ectoparassiti reperiti nella spigola nei diversi sistemi di allevamento

Le specie di ectoparassiti identificate nelle spigole esaminate sono sostanzialmente le stesse riportate in passato in letteratura (Papoutsoglou *et al.*, 1996; Fioravanti *et al.*, 2006; Vagianou *et al.*, 2006).

Nella tabella e nel grafico seguenti vengono schematizzate le prevalenze complessive per parassiti rilevate nella spigola in relazione alla tipologia d'allevamento.

Sistema di allevamento	Paese	Esaminati	Positivi (%)
Estensivo	Grecia	0	0
	Italia	10	10 (100%)
Terra	Grecia	26	101 (25,7%)
	Italia	439	185 (42,1%)
GSC	Grecia	80	10 (12,5%)
	Italia	295	245 (83,1%)
GFC	Grecia	0	0
	Italia	56	52 (92,9%)
GSO	Grecia	0	0
	Italia	10	10 (100%)
Totale	Grecia	106	111 (95,5%)
	Italia	810	502 (62%)

Percentuali di positività per ectoparassiti in spigola in base al sistema di allevamento

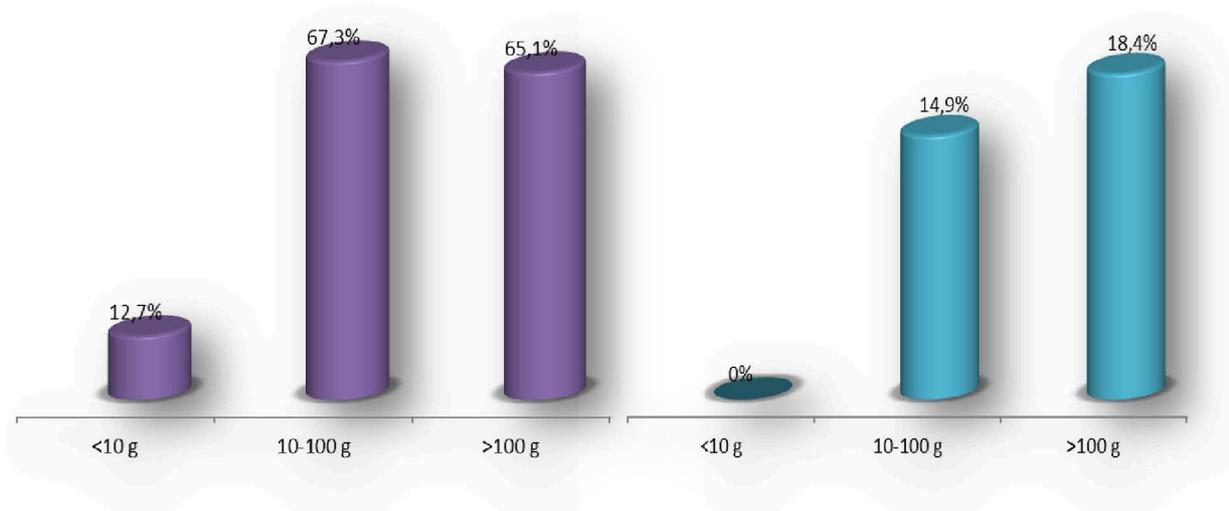


Positività riscontrate per ectoparassiti nelle spigole allevate in Italia (sx) e Grecia (dx) in base al sistema di allevamento (n.e.= non esaminati)

Per quanto concerne le percentuali di positività complessive per parassiti osservate nelle diverse categorie di taglia, i valori sono schematizzati nella seguente tabella e nel grafico 3.

Categoria di taglia	Paese	Esaminati	Positivi (%)
<10 g	Grecia	69	0
	Italia	463	59 (12,7%)
10-100 g	Grecia	67	10 (14,9%)
	Italia	456	307(67,3%)
>100 g	Grecia	114	21 (18,4%)
	Italia	209	136 (65,0%)
Totale	Grecia	250	31 (12,4%)
	Italia	1128	502 (44,5%)

Positività per *parassiti* nelle spigole esaminate in base alla classe di taglia e al paese di provenienza

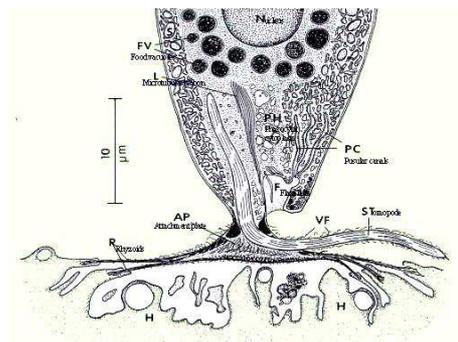


Positività riscontrate per ectoparassiti nelle spigole allevate in Italia (sx) e Grecia (dx) in base alla taglia

Vengono qui di seguito presentate le schede descrittive relative alle diverse specie parassitarie riscontrate nella spigola, con illustrazione delle differenze significative osservate in relazione a tipologia d'allevamento, categoria di taglia e Paese, nonché con le osservazioni relative agli effetti patogeni sull'ospite.

AMYLOODINIUM OCELLATUM

La amiloodiniosi o “malattia del velluto”, sostenuta dal protozoo dinoflagellato *Amyloodinium ocellatum* Brown, 1931 è una delle malattie parassitarie più importanti dei pesci marini (Becker, 1977; Lauckner, 1984; Noga, 1996). La forma parassitaria, rappresentata dal trofante, ha forma ovalare e dimensioni comprese in genere tra 20 a 150 µm di diametro, sebbene possa raggiungere 350 µm. Diversamente da *Piscinoodinium pillulare*, dinoflagellato dulciacquicolo, non è pigmentato in quanto non contiene cloroplasti, ma è provvisto di granuli di amido, vacuoli digestivi e di un caratteristico stigma verso la parte basale (Lom & Lawler, 1973). Quest'ultima rappresenta la zona atta all'adesione/attacco all'epitelio dell'ospite e presenta numerose proiezioni filiformi o “rizoidi” in grado di ancorarsi alle cellule. Una volta maturo, il trofante si circonda di una capsula di cellulosa, quindi ritrae i rizoidi, si stacca dall'ospite e cade sul fondo, dove si trasforma in tomonte, che rappresenta lo stadio di replicazione del parassita. Da ogni trofante si sviluppano 256 dinospore, stadio infettante per il pesce, che sono flagellate e presentano colorazione giallo-verdastra, forma tondeggianti e dimensioni di 10-12,5 µm. Il ciclo biologico di *A. ocellatum* è regolato in modo primario dalla temperatura: tra 23 e 27°C può realizzarsi in meno di una settimana. Va comunque tenuto presente che tra 16 e 30°C il ciclo subisce rallentamenti ma non viene arrestato (Paperna, 1984). Un altro fattore ambientale di grande importanza, parallelamente alla temperatura, è rappresentato dalla luce (Noga & Bower, 1987; Noga & Levy,



1995). La localizzazione primaria di *Amyloodinium ocellatum* nei pesci marini adulti è prevalentemente branchiale e solo nel corso di gravi infezioni può localizzarsi anche su cute, pinne ed occhi. I trofonti possono localizzarsi anche sulle pseudobranchie e nelle fossette nasali (Lawler, 1980).

L'amiloodiniosi ha una distribuzione cosmopolita in zone temperate, tropicali e sub-tropicali. Le specie ittiche sensibili sono moltissime, particolarmente nelle fasi giovanili che sviluppano la malattia in forma più grave. I soggetti che superano la malattia sembrano essere resistenti a successive reinfezioni (Paperna, 1980b).

I segni clinici dell'amiloodiniosi comprendono anoressia, letargia, dispnea con nuoto superficiale ed irregolare (Noga, 1987). Sebbene sia conosciuta anche come "malattia del velluto" in relazione all'aspetto che assume la cute quando gravemente parassitata, nei pesci marini d'allevamento questo reperto è poco frequente, al contrario di quanto descritto in pesci marini d'acquario. Infezioni di media entità (1-2 trofonti/filamento branchiale) non causano in genere gravi lesioni, soprattutto quando rapidamente controllate, mentre infezioni gravi (fino a 200 trofonti/filamento branchiale) provocano evidenti reazioni infiammatorie, fenomeni emorragici e necrosi. Il fatto che i trofonti possano muoversi lentamente da una cellula all'altra sembra possa aggravare il danno arrecato alle cellule epiteliali dell'ospite (Noga, 1987). La morte è di solito riferita ad anossia conseguente alle gravi lesioni al tessuto branchiale e, nei casi più gravi, si rileva anche entro 12 ore dall'infezione (Lawler, 1980). Tuttavia la mortalità elevata che talvolta si associa ad infezioni di media entità, suggerisce l'intervento di fenomeni tossici che non risultano ancora chiariti (Colorni, 2005, com. pers.). Gravi alterazioni dell'osmoregolazione ed infezioni secondarie giocano infine un ruolo importante nel determinismo della malattia (Noga & Levy, 1995). La diagnosi si basa essenzialmente sull'individuazione del parassita in raschiati cutanei e branchiali mediante osservazione microscopica a fresco, facilitata dall'aggiunta di Lugol al preparato (Lawler, 1980; Noga, 1996). La prevenzione dell'amiloodiniosi si basa sulla quarantena dei pesci di nuova introduzione per un periodo la cui durata varierà in base alla

temperatura dell'acqua e, quando ciò non è possibile, sul controllo parassitologico di un numero significativo di soggetti. Nelle avannotterie la filtrazione dell'acqua in entrata con filtri UV è efficace nel devitalizzare le dinospore infettanti. Sebbene non autorizzato per l'acquacoltura, il solfato di rame a dosi di 1 ppm per 1 ora o 0,1 ppm per 7-10 giorni (dosi relative a ioni Cu liberi) può risultare efficace nel trattamento dell'infezione.

ANALISI DESCRITTIVA DEI RISULTATI

A. ocellatum è stato reperito complessivamente in 26 (3,2%) delle 810 spigole esaminate, ma solo in soggetti provenienti da sistemi d'allevamento intensivi a terra in Italia, come schematizzato nella tabella sottostante. Il valore di prevalenza limitato a quest'ultima categoria aumenta al 5,9% ma rimane sensibilmente inferiore a studi analoghi effettuati in passato dove la stessa tipologia di impianto presentava valori del 12,6%, mentre l'allevamento estensivo in valli da pesca addirittura raggiungeva il 34,1% di positività (Fioravanti *et al.*, 2006).

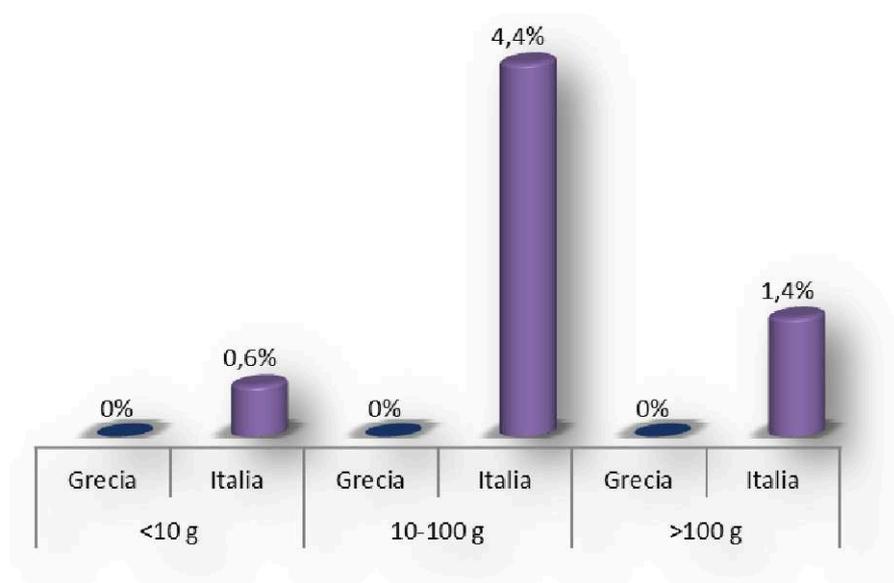
<i>Amyloodinium ocellatum</i>	Paese	Esaminati	Positivi (%)
Terra	Grecia	26	0
	Italia	439	26 (5,9%)
GSC	Grecia	80	0
	Italia	295	0
GFC	Grecia	0	0
	Italia	56	0
GSO	Grecia	0	0
	Italia	10	0
Estensivo	Grecia	0	0
	Italia	10	0
Totale	Grecia	106	0
	Italia	810	26 (3,2%)

Positività per *A. ocellatum* delle spigole esaminate in base al sistema di allevamento e al paese di provenienza

Per quanto concerne la presenza di *A. ocellatum* nelle diverse categorie di taglia, le percentuali di positività più elevate sono state rilevate nei soggetti di peso compreso tra 10g e 100g. Nella tabella e nel grafico seguenti sono schematizzati i risultati.

<i>Amyloodinium ocellatum</i>	Paese	Esaminati	Positivi (%)
<10 g	Grecia	69	0
	Italia	463	3 (0,6%)
10-100 g	Grecia	67	0
	Italia	456	20 (4,4%)
>100 g	Grecia	114	0
	Italia	209	3 (1,4%)
Totale	Grecia	250	0
	Italia	1128	26 (2,3%)

Positività per *A. ocellatum* delle spigole esaminate in base alla classe di taglia e al paese di provenienza

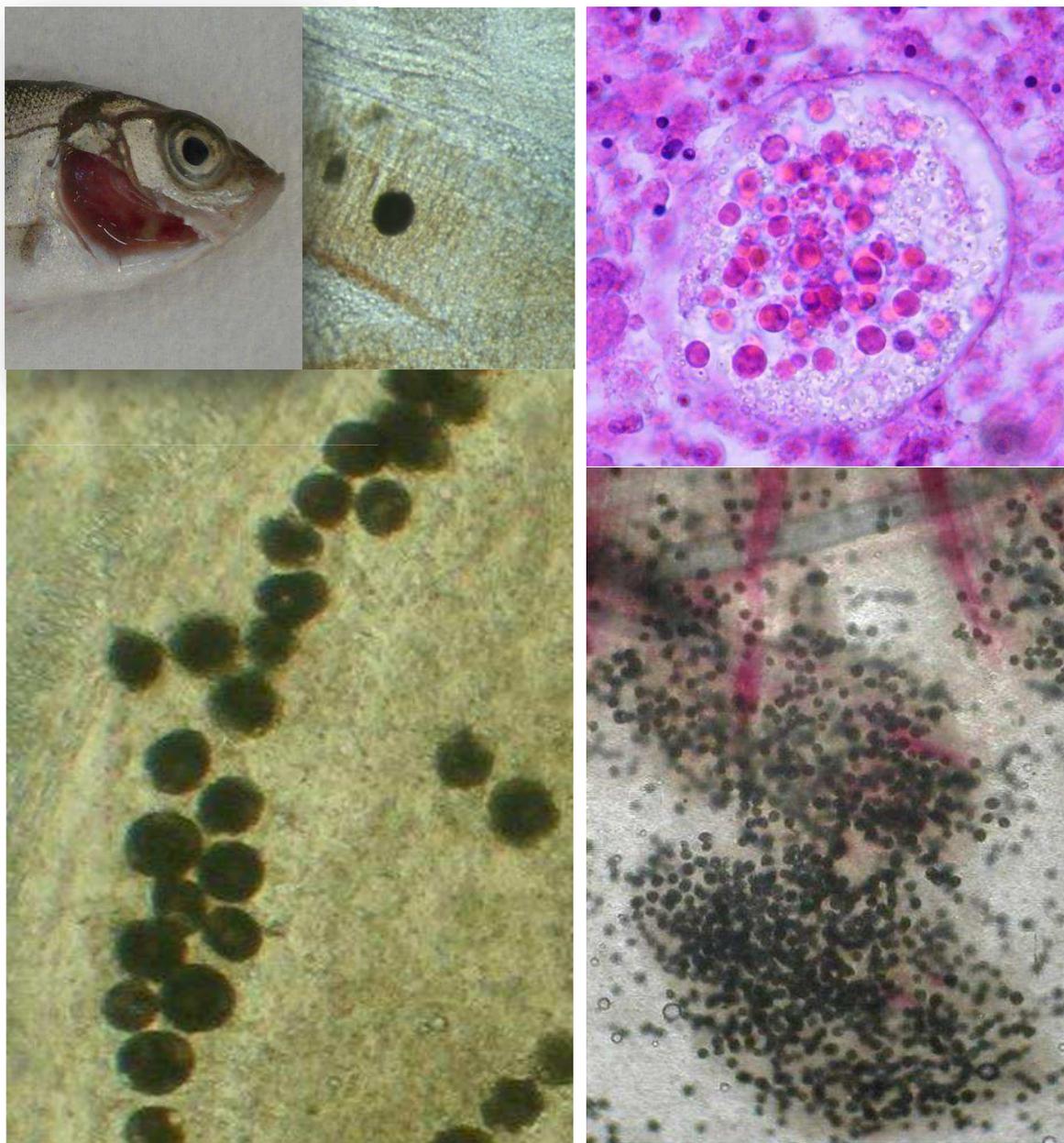


Il reperimento del parassita solo in pesci allevati in sistemi “a terra” intensivi può essere spiegato con il ciclo biologico di *A. ocellatum*, che prevede lo sviluppo delle fasi riproduttive sul fondo, con accumulo favorito da condizioni di scarso ricambio idrico e scarsa igiene del fondo e sviluppo sul fondo di stadi infettanti che, dovendo raggiungere in poche ore l’ospite, vengono favoriti da ambienti caratterizzati da una ridotta profondità della colonna d’acqua.



Ciclo biologico di *Amyloodinium ocellatum*

Il numero limitato di spigole esaminate provenienti dall'allevamento estensivo, anch'esso ritenuto particolarmente idoneo allo sviluppo delle fasi di *A. ocellatum*, non ha permesso di verificarne la presenza/assenza in modo certo.



Trofonti di *A. ocellatum* in branchie di spigola osservati a fresco (1, 2 e 3) ed in preparato istologico (4) (EE, 100 \times).



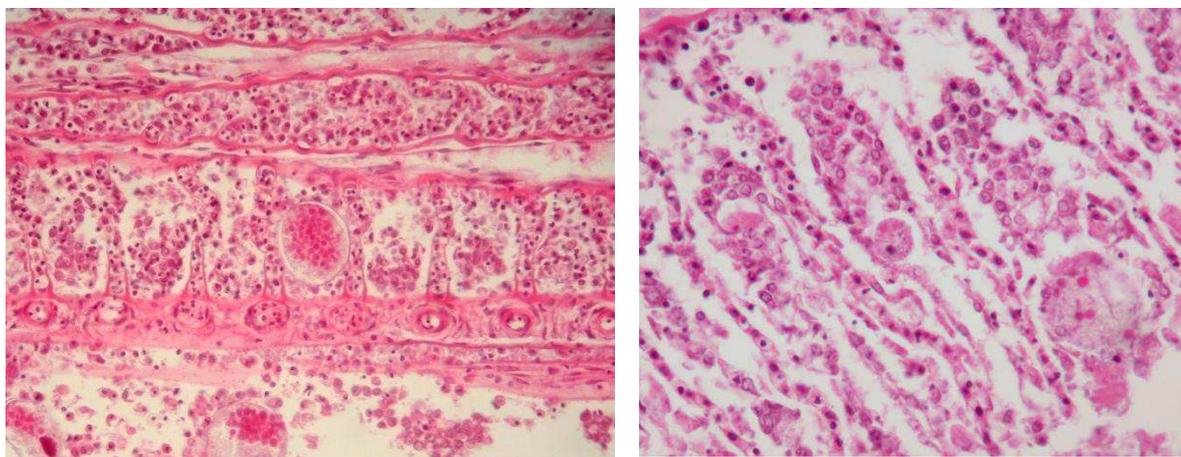
Nel periodo estivo-autunnale (temperature >22°C), nei soggetti provenienti da allevamenti intensivi a terra si sono osservate sempre infezioni sostenute anche da >100 trofonti/filamento branchiale.

EFFETTI PATOGENI SULL'OSPITE

Gli esami istopatologici condotti su soggetti fortemente parassitati da *A. ocellatum*(>50 trofonti/filamento) hanno evidenziato iperplasia dell'epitelio branchiale, nel quale i dinoflagellati erano inglobati, con pressoché totale fusione delle lamelle, necrosi, sfaldamento cellulare ed emorragie. Si osservava inoltre congestione dei vasi dei filamenti branchiali. All'Ematossilina-Eosina i trofonti variavano di misura, erano ovali o rotondeggianti con granuli eosinofili.

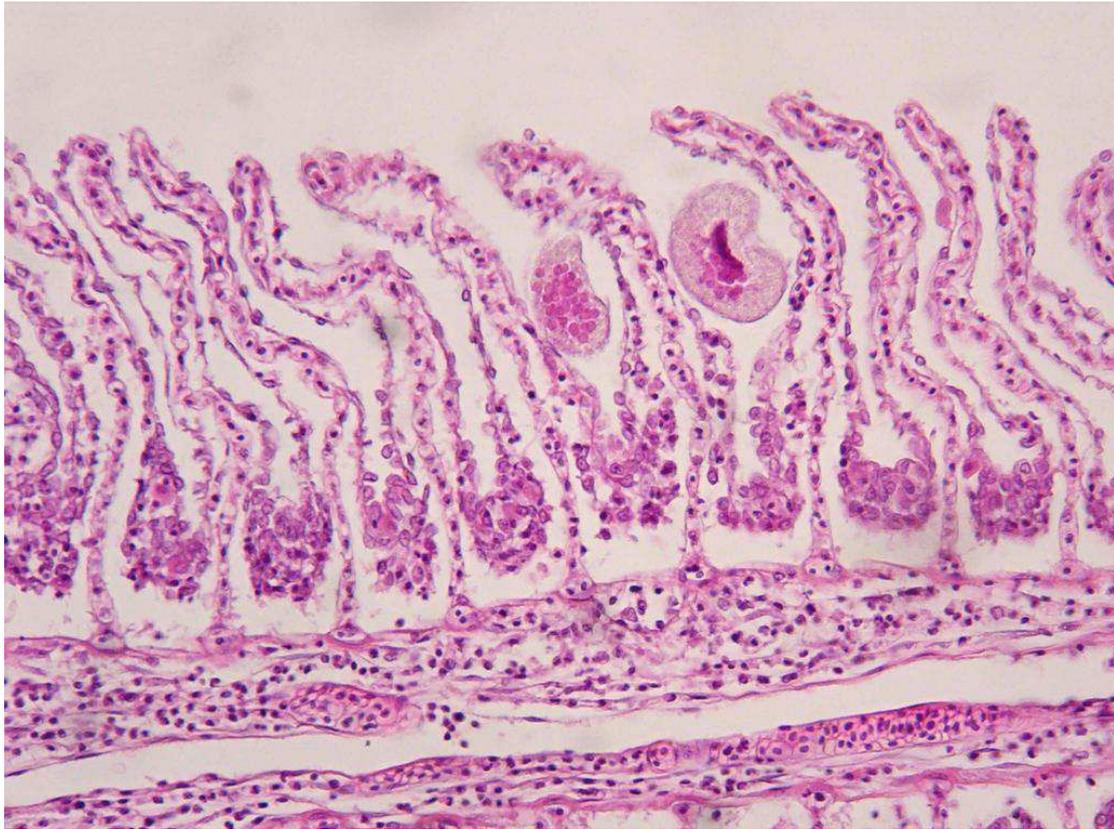
L'impianto del parassita provocava un notevole aumento delle cellule mucipare ed iperproduzione di muco, edema e reazioni infiammatorie, atrofia e necrosi.

Le lesioni sono perlopiù sovrapponibili a quelle osservate da altri autori in passato (Noga, 2012; Woo, 1995; Ferguson, 2006)

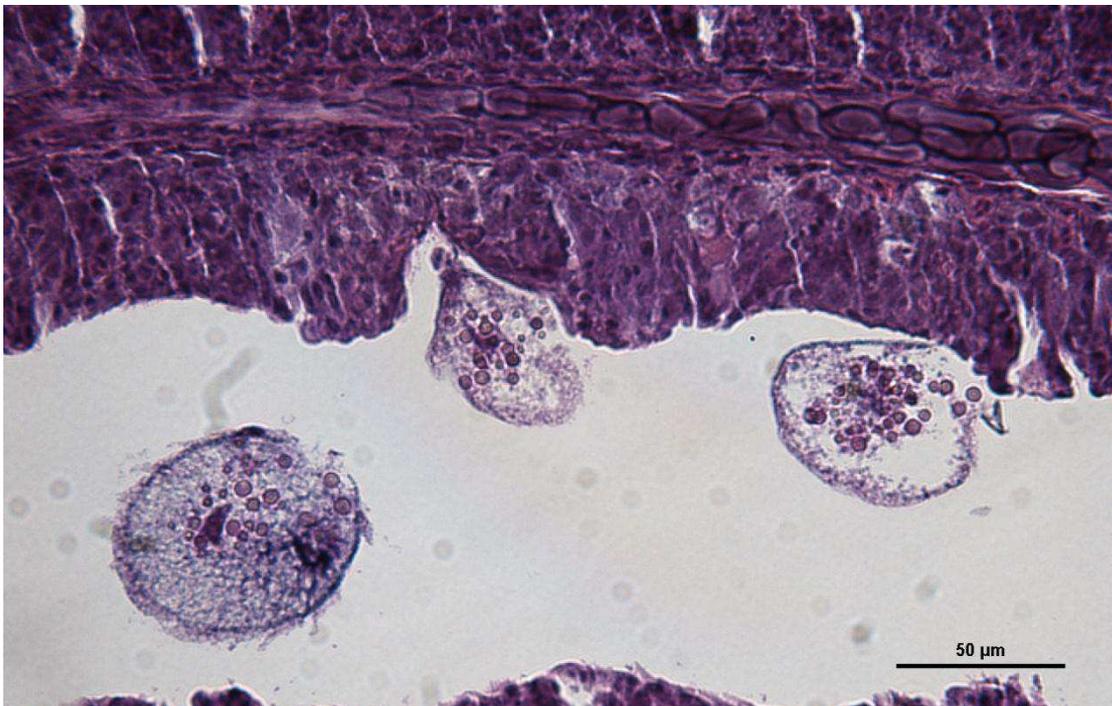


Branchie di spigola con trofonti di *A. ocellatum* a diverso grado di sviluppo. I parassiti sono visibili tra le lamelle che presentano iperplasia, edema e sfaldamento cellulare (EE, 10×).

Anche se lievi infezioni (1-2 trofonti per filamento branchiale) sembra possano provocare lesioni negli avannotti, negli adulti il quadro istologico appariva nella norma e solo in infezioni sostenute da un maggior numero di trofonti si osservavano le alterazioni sopra descritte.



Branchie di spigola con trofonti di *A. ocellatum* a diverso grado di sviluppo. I parassiti sono visibili tra le lamelle che presentano iperplasia, edema e sfaldamento cellulare (EE, 10×).



Branchie di spigola con trofonti di *A. ocellatum* (di cui uno infisso nel tessuto branchiale) tra le lamelle che si presentano fuse tra loro (EE, 40×).

CRYPTOBIA BRANCHIALIS

Protozoo flagellato dal corpo allungato od ovale con 2 flagelli che originano dalla porzione anteriore (uno è ricorrente ed esce libero all'estremità posteriore), di dimensioni in genere inferiori a 10 µm e con riproduzione per fissione binaria longitudinale. Considerato essenzialmente un organismo commensale, può localizzarsi a livello cutaneo e branchiale, intestinale o ematico a seconda della specie (Lom & Dyková, 1992). Diversamente da specie ematozoiche congeneriche, *C. branchialis* ha ciclo diretto e si trasmette direttamente, favorito da condizioni di scarso ricambio idrico, elevato carico organico ed elevate densità di biomassa.

Nei pesci marini, soprattutto spigole ed orate, viene frequentemente descritta la specie *Cryptobia branchialis* su cute e branchie, dove sembra possa esplicare azione patogena rilevante quando è presente ad elevate intensità d'infezione (Alvarez-Pellitero, 2004).

I pesci massivamente parassitati possono mostrare appetito capriccioso fino ad anoressia, iperproduzione di muco, iperplasia dell'epitelio branchiale ed emorragie. In alcuni casi è stata descritta mortalità a stitico, protratta nel tempo, con perdite che possono arrivare al 10% in diverse settimane (Alvarez-Pellitero, 2004).

L'esame a fresco di preparati ottenuti per raschiamento da branchie o cute fornisce una rapida diagnosi, poi confermata mediante osservazione di preparati a secco colorati con Giemsa e/o di sezioni istologiche.

Bagni di formalina a 150 ppm, prodotto non autorizzato in acquacoltura, si sono dimostrati efficaci sperimentalmente nel controllo del parassita, sebbene in relazione al carattere opportunistico di *C. branchialis* risultino importanti gli interventi volti a migliorare la qualità dell'ambiente d'allevamento (Bruno *et al.*, 1997).

ANALISI DESCRITTIVA DEI RISULTATI

La presenza di flagellati morfologicamente riferibili a *Cryptobia branchialis* è stata riscontrata in 18 (2%) delle 916 spigole esaminate, con positività

esclusivamente in soggetti allevati in sistemi intensivi a terra, come schematizzato nella tabella seguente.

<i>Cryptobia branchialis</i>	Paese	Esaminati	Positivi (%)
Terra	Grecia	26	0
	Italia	439	18 (4,1%)
GSC	Grecia	80	0
	Italia	295	0
GFC	Grecia	0	0
	Italia	56	0
GSO	Grecia	0	0
	Italia	10	0
Estensivo	Grecia	0	0
	Italia	10	0
Totale	Grecia	106	0
	Italia	810	18 (2,2%)

Positività per *Cryptobia branchialis* nelle spigole esaminate in base al sistema di allevamento e al paese di provenienza

Il 4,1% riportato per gli allevamenti intensivi a terra in Italia risulta più alto di quanto riportato da Fioravanti *et al.* nel 2006 (0,5%) e si sono osservati alcuni casi di elevate intensità di infezione ma in pesci di taglia >100g, quindi in grado di sopportare senza grossi problemi la presenza del parassita.

Per quanto concerne la presenza di *C. branchialis* nelle diverse categorie di taglia infatti, i valori di prevalenza hanno mostrato percentuali di positività più elevate nei soggetti di peso >100 g.

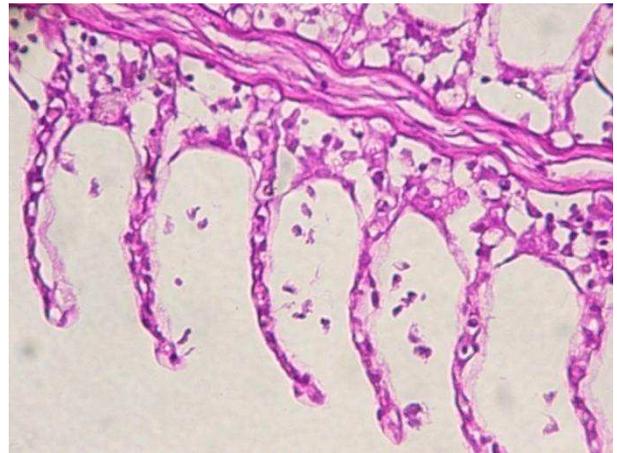
Valori inferiori sono stati riferiti alle spigole di peso compreso tra 10 e 100 g, mentre i soggetti di peso <10g sono sempre risultati negativi. Nella seguente tabella sono schematizzati i risultati.

<i>Cryptobia branchialis</i>	Paese	Esaminati	Positivi (%)
<10 g	Grecia	69	0
	Italia	463	0
10-100 g	Grecia	67	0
	Italia	456	7 (0,9%)
>100 g	Grecia	114	0
	Italia	209	11(5,3%)
Totale	Grecia	250	0
	Italia	1128	18(1,6%)

Positività per *Cryptobia branchialis* delle spigole esaminate in base alla classe di taglia e al paese di provenienza

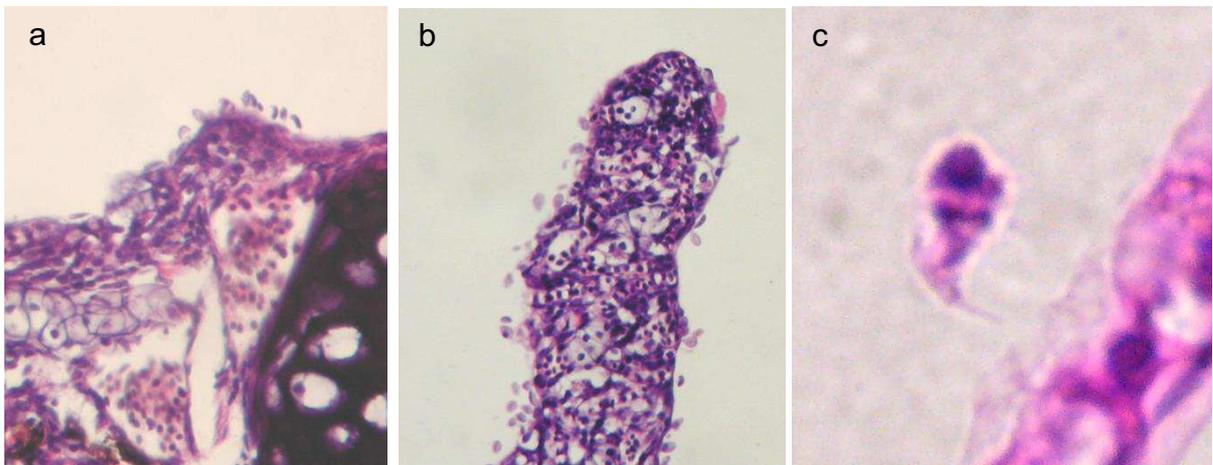
EFFETTI PATOGENI SULL'OSPITE

All'esame istologico i protozoi flagellati si riscontravano infissi nell'epitelio branchiale. Ad elevate intensità d'infezione le branchie presentavano edema diffuso sia nelle lamelle che nei filamenti. Si riscontrava inoltre lieve iperplasia alla base dei filamenti con congestione nelle arteriole afferenti ed efferenti.



Sezione di branchie di spigola: numerosi flagellati riferibili a *C. branchialis* liberi o adesi all'epitelio (EE, 10×)

Basse intensità d'infezione non davano luogo ad alterazioni patologiche evidenti.



C. branchialis in spigola: numerosi parassiti adesi all'epitelio branchiale con edema delle lamelle (a, b) (EE, 40×); *C. branchialis* con flagello infisso nell'epitelio (c) (EE, 100×).

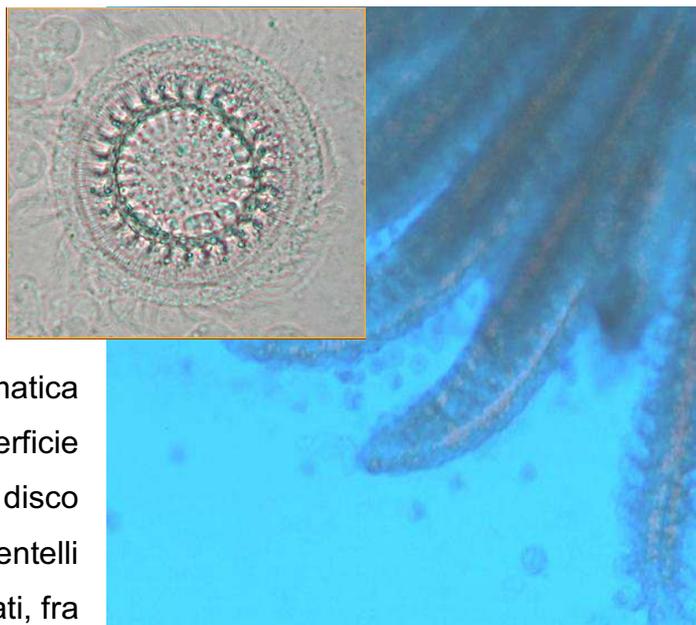
TRICHODINA SPP.

Il genere *Trichodina* comprende diverse specie di ciliati peritrichi a forma di disco piatto emisferico, con nucleo a ferro di cavallo e ciliatura somatica ridotta a 3-4 giri intorno alla superficie aborale caratterizzata da un disco adesivo a ventosa dotato di dentelli che permette di aderire ai substrati, fra cui anche cute e branchie di pesci. Questi ciliati sono dotati di un *velum* per il movimento, si riproducono per fissione binaria longitudinale ed hanno ciclo biologico diretto. Il diametro è in genere tra 50 e 100 μm , a seconda della specie considerata (Lom & Dyková, 1992).

Si tratta di ciliati a diffusione cosmopolita nel mezzo acquatico e, sebbene la maggior parte delle specie di *Trichodina* possano essere considerate ectocommensali, in taluni casi possono essere patogene in via primaria (alcune specie sono considerate parassiti obbligati) o secondaria. Possono infatti replicare velocemente e diffondere sotto la spinta di condizioni predisponenti quali scarso ricambio idrico, presenza di materiale organico, ecc. Quando sono presenti in elevate quantità possono determinare iperproduzione di muco, "intorbidimento" cutaneo, erosioni talvolta a carattere emorragico, iperplasia branchiale e problemi respiratori (Lom, 1995).

ANALISI DESCRITTIVA DEI RISULTATI

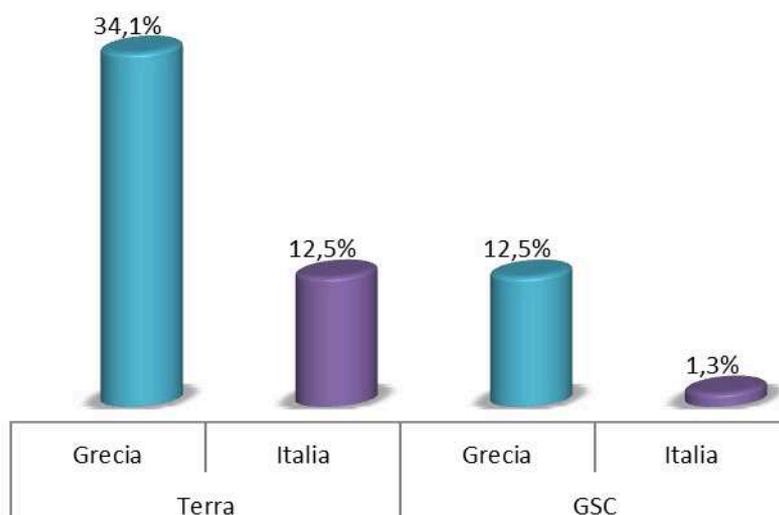
La presenza di *Trichodina* spp. è stata rilevata a livello branchiale e cutaneo in 78 (8,5%) delle 916 spigole esaminate e solo in soggetti allevati in sistemi intensivi "a terra" e in gabbia sotto costa, a conferma dell'importanza che i parametri ambientali rivestono nel modulare l'abbondanza di questi ciliati



peritrici nell'ambiente d'allevamento e sull'ospite. Nella tabella e nel grafico seguenti vengono schematizzati i valori di prevalenza per sistema d'allevamento.

<i>Trichodina</i> spp.	Paese	Esaminati	Positivi (%)
Estensivo	Grecia	0	0
	Italia	10	0
Terra	Grecia	26	9 (34,6%)
	Italia	439	55 (12,5%)
GSC	Grecia	80	10 (12,5%)
	Italia	295	4 (1,3%)
GFC	Grecia	0	0
	Italia	56	0
GSO	Grecia	0	0
	Italia	10	0
Totale	Grecia	106	19 (17,9%)
	Italia	810	59 (7,3%)

Positività per *Trichodina* spp. delle spigole esaminate in base al sistema di allevamento e al paese di provenienza



Percentuali di positività per *Trichodina* spp. in spigola in base al sistema di allevamento

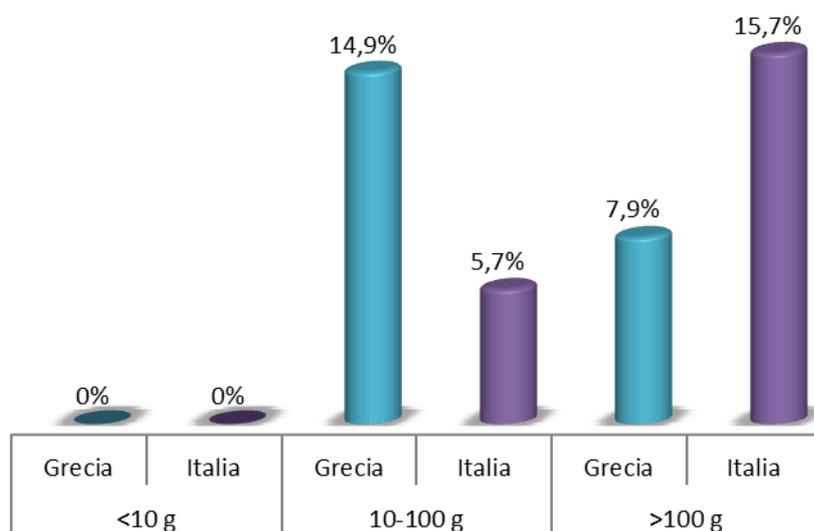
Sia in Grecia che in Italia gli impianti a terra si sono dimostrati ambienti maggiormente idonei allo sviluppo di questo gruppo di parassiti, causa il minore ricambio idrico che li caratterizza rispetto ai sistemi in gabbia. Spiccano i valori

di positività nei sistemi a terra in Grecia (34,1%) ottenuti però su una base campionaria molto limitata e quindi meno attendibili rispetto agli altri.

Anche per quanto concerne le diverse categorie di taglia le percentuali di positività per *Trichodina* spp. hanno presentato valori più elevati nei soggetti di peso >100g in Italia e nei soggetti di peso compreso tra 10 e 100g in Grecia, mentre i soggetti di peso <10g sono risultati negativi in entrambi i paesi, come si evince dalla tabella e dal grafico nella pagina successiva.

<i>Trichodina</i> spp.	Paese	Esaminati	Positivi (%)
<10 g	Grecia	69	0
	Italia	463	0
10-100 g	Grecia	67	10(14,9%)
	Italia	456	26(5,7%)
>100 g	Grecia	114	9(7,9%)
	Italia	209	33(15,7%)
Totale	Grecia	250	19(7,6%)
	Italia	1128	59(5,2%)

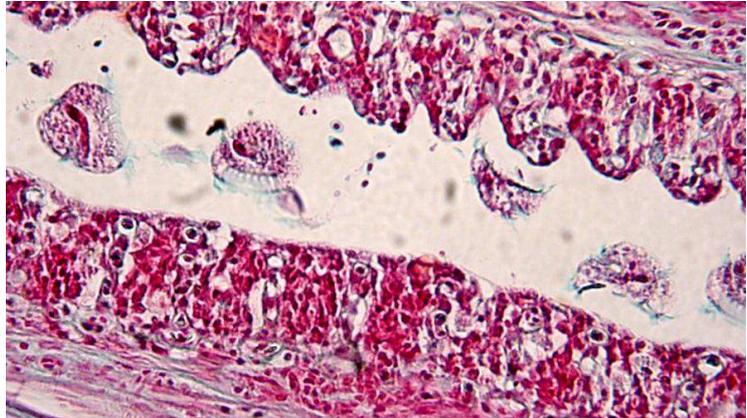
Positività per *Trichodina* spp delle spigole esaminate in base alla classe di taglia e al paese di provenienza



Percentuali di positività per *Trichodina* spp. delle spigole esaminate in base alla classe di taglia

EFFETTI PATOGENI SULL'OSPITE

Nelle infezioni da parassiti Trichodinidae che si è avuta occasione di osservare, le lesioni si presentavano strettamente correlate all'intensità d'infezione e solo nel caso di infezioni massive si è evidenziata iperplasia dell'epitelio branchiale con



Numerose *Trichodina* sp. alla base di lamelle branchiali con iperplasia dell'epitelio (Gram, 100×).

fusione parziale o totale dei filamenti. Non si sono riscontrati congestione o fenomeni emorragici né iperproduzione di muco, sebbene fosse evidente una lieve ipertrofia delle cellule mucipare. Nessun episodio di mortalità è stato direttamente correlato alla presenza di *Trichodina* spp., indicando la bassa patogenicità che contraddistingue questi peritrichi mobili, saltuariamente imputati di episodi morbosi (Paperna *et al.*, 1977; Yemmen *et al.*, 2011)

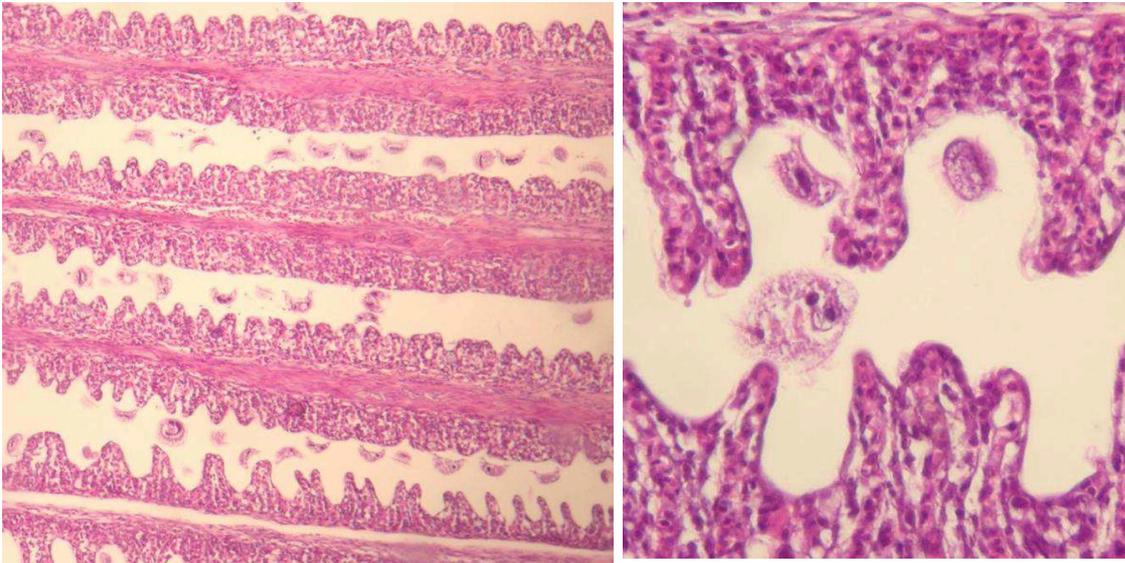
Ad intensità d'infezione più lieve si osservava solo una lieve iperplasia dell'epitelio branchiale.

Nei preparati istologici allestiti la colorazione di Gram si è dimostrata particolarmente efficace nel differenziare le diverse strutture del parassita.



Trichodina sp. in sezione istologica di branchie di spigola (Gram, 100×).

All'esame istologico si osservavano protozoi peritrichi di aspetto diverso a seconda dell'orientamento assunto nelle sezioni. Essi apparivano di forma appiattita, emisferica, a cuffia, a campana, sacciformi, cilindrici in sezione trasversa o rotondi a disco in posizione orale od aborale. Con il metodo di Gram, le cilia assumevano una colorazione azzurra. In alcuni protozoi era evidente il macronucleo.



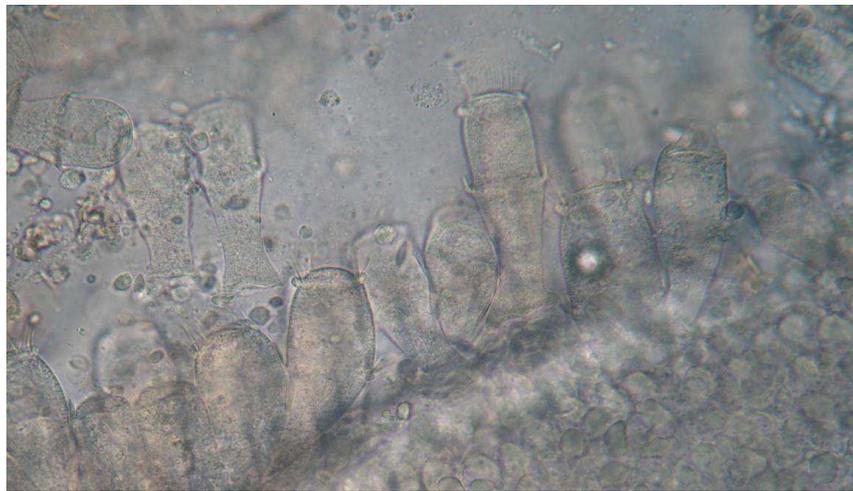
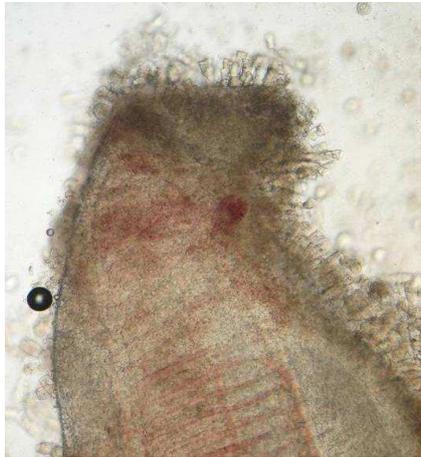
Filamenti branchiali di spigola. Infezione massiva da protozoi Trichodinidae, iperplasia epiteliale con parziale e totale fusione delle lamelle (EE, 4×, 10×).

PERITRICHI SESSILI

Questi ciliati sessili presentano un corpo cilindrico, conico o a campana, sempre attaccato ad un substrato, la ciliatura somatica è ridotta ad una fila equatoriale, l'organo di attacco (scopula) risiede a livello del polo antiapicale.



La scopula si attacca al substrato direttamente, tramite materiale colloso o mediante peduncolo. Le dimensioni variano nel genere *Apiosoma* fino a 110 μm . Sono cosmopoliti e, possono parassitare specie ittiche dulciacquicole, marine ed eurialine a livello di cute e branchie. Il ciclo biologico è diretto.



Branchie di spigola: massiva infestazione da peritrichi sessili che colonizzano l'intera superficie dei filamenti branchiali

Benché considerati ectocommensali, possono provocare lesioni in pesci debilitati o stressati e con invasioni massive dell'epitelio branchiale possono causare ridotta funzionalità respiratoria e maggiore suscettibilità agli stress (Lom, 1995). Con il loro attacco a disco, essi penetrano nella pelle dei pesci, secernono un enzima che scioglie le squame e ne risulta una lesione infiammata, come un foro, la quale può essere secondariamente complicata da

batteri. La malattia può essere controllata solo con prodotti non autorizzati quali permanganato di potassio (2 ppm) o formalina (15 ppm) (Rogers, 1971).

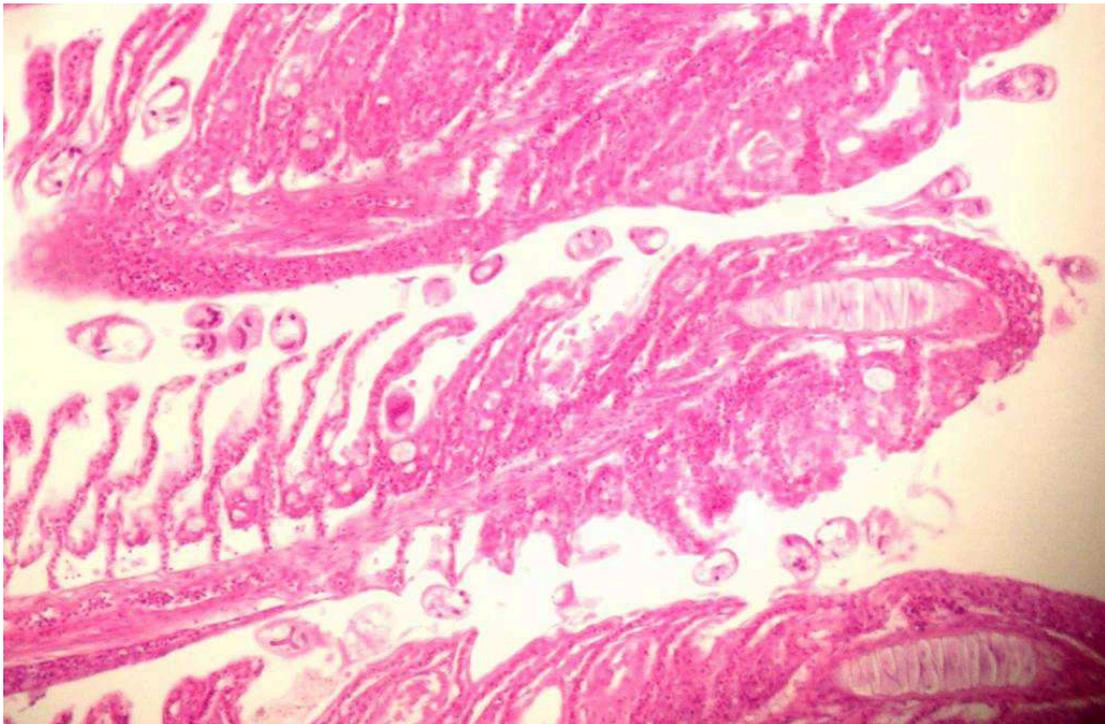
ANALISI DESCRITTIVA DEI RISULTATI

La presenza di peritrichi sessili è stata rilevata solo in 5 (0,5%) delle 916 spigole esaminate, e solo in soggetti allevati in sistemi intensivi a terra, dove la positività su 439 spigole allevate a terra è risultata del 1,1%.

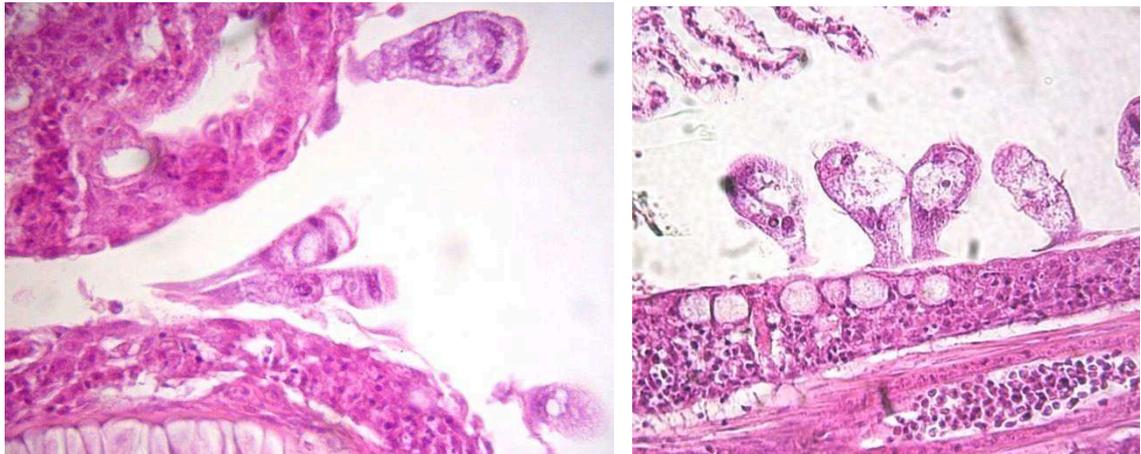
I soggetti parassitati erano tutti adulti di peso compreso tra 10 e 100g.

EFFETTI PATOGENI SULL'OSPITE

Nei due soggetti sui 5 positivi che presentavano infezioni massive sostenute da questi ciliati si è osservata iperplasia branchiale con parziale fusione delle lamelle, edema anche grave ed ipertrofia/iperplasia delle cellule mucipare.



Branchie di spigola: protozoi peritrichi sessili sulla superficie branchiale, iperplasia epiteliale con ipertrofia delle cellule mucipare (EE, 10×).



Branche di spigola: lamelle branchiali infettate da protozoi peritrichi sessili (sinistra); i protozoi sono disposti in sequenza sulla superficie branchiale che presenta iperplasia epiteliale ed ipertrofia delle cellule mucipare (destra) (EE. 100×)

Peritrichi sessili erano osservati adesi alla superficie delle lamelle branchiali. I protozoi si presentavano a forma di sacco allungato con ciglia a corona in posizione apicale. Un ampio macronucleo, vacuoli digestivi e granuli intracitoplasmatici erano spesso visibili.

Solo infestazioni di stadi giovanili di pesci, la cui respirazione avviene in parte anche per via transcutanea sono generalmente in grado di originare episodi morbosi, salvo casi di infestazioni massive associate a stati di debilitazione del pesce, solitamente all'origine di una colonizzazione anormale da parte di questi ciliati commensali (Alvarez-Pellitero *et al.*, 1993; Kuperman *et al.*, 2001).

DIPLECTANUM AEQUANS

Diplectanum aequans è un trematode monogeneo caratterizzato da corpo allungato ed appiattito in senso dorso-ventrale, lunghezza tra 300 μm e 2 mm, dotato posteriormente di un robusto organo d'attacco (*opisthaptor*) composto di due paia d'uncini (*hamuli*) uniti da una o due barre trasversali e coadiuvato da una struttura composta di piccole spine disposte ad impronta digitale (*squamodisco*). Nella porzione cefalica sono presenti una ventosa e due paia di macchie oculari. Si riproduce per oviparità e presenta



ciclo biologico diretto (Möller & Anders, 1986). Una volta in acqua, l'uovo schiude e lascia fuoriuscire una larva ciliata (oncomiracidio) che entro 24-48 ore andrà ad attaccarsi a livello cutaneo ad un nuovo ospite, dove migrerà nelle branchie e diventerà individuo adulto in un periodo variabile a seconda della temperatura (Giavenni, 1983).

Pur mostrando una notevole resistenza ad un ampio intervallo termico, *D. aequans* predilige temperature tra 18 e 20°C ed è di frequente riscontro durante tutto l'anno in spigole selvatiche e d'allevamento (Bruno *et al.*, 1997). Cecchini *et al.* (2001) hanno messo in evidenza come la schiusa delle uova in condizioni *in vitro* possa essere osservata a temperature che oscillano tra i 10°C ei 30°C, mentre viene inibita a temperature di 5°C.

La patogenicità è correlata all'azione meccanica esercitata dall'organi di attacco del parassita sulle lamelle secondarie delle branchie, provocando

irritazioni, reazioni infiammatorie, emorragie, fusioni apicali e, più in generale, malattia branchiale (Oliver, 1977).

Nei casi di infestazioni lievi si può avere un quadro paucisintomatico e asintomatico, mentre ad elevate intensità di infestazione si riscontrano inappetenza, dimagrimento ed atteggiamento asfittico con nuoto superficiale e letargica. Sembra che siano necessari migliaia di adulti per dare mortalità nei pesci adulti (Giavenni, 1983).

La sua importanza sanitaria non va comunque sottovalutata in relazione ai cali produttivi che possono derivare dal disturbo arrecato all'attività alimentare dell'ospite ed alla frequente irruzione di patogeni secondari nei siti branchiali parassitati. L'eccessiva quantità di sostanze azotate o condizioni di ipossia possono accrescere la suscettibilità dell'ospite all'infezione.

La diagnosi è essenzialmente microscopica, mediante osservazione del muco branchiale o di porzioni dei filamenti branchiali.

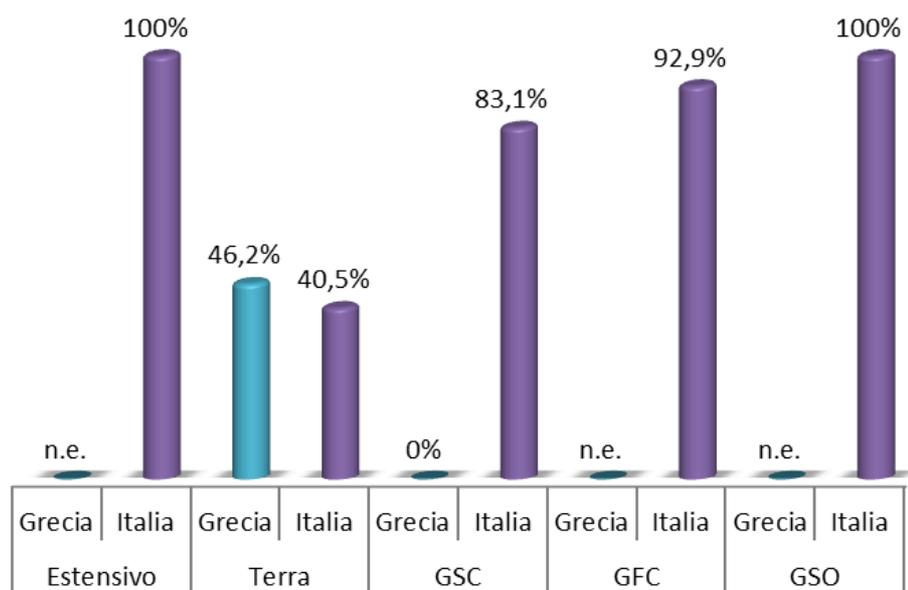
I trattamenti di formalina, non autorizzati, anche ad alti dosaggi risultano inefficaci nei confronti delle forme adulte (Giavenni, 1983; Silan & Maillard, 1986), che vengono invece devitalizzate dagli esteri fosforici. Cicli di trattamenti con formalina a 200-250 ppm per 60 minuti per 2 giorni consecutivi e ripetuti per 2-3 volte a giorni alterni possono comunque essere efficaci per ridurre drasticamente l'infestazione. La prevenzione della diplectanosi, oltre al controllo dei pesci di nuova introduzione, deve basarsi sulla conduzione di buone pratiche igieniche con vuoto sanitario delle vasche e pulizia del fondo.

ANALISI DESCRITTIVA DEI RISULTATI

D. aequans è stato reperito a livello branchiale in 507 (55,3%) delle 916 spigole esaminate, con valori diversi a seconda del sistema d'allevamento, come schematizzato nella tabella seguente e nel grafico nella pagina successiva.

<i>Diplectanum aequans</i>	Paese	Esaminati	Positivi (%)
Estensivo	Grecia	0	0
	Italia	10	10 (100%)
Terra	Grecia	26	12 (46,2%)
	Italia	439	178 (40,5%)
GSC	Grecia	80	0
	Italia	295	245 (83,1%)
GFC	Grecia	0	0
	Italia	56	52(92,9%)
GSO	Grecia	0	0
	Italia	10	10 (100%)
Totale	Grecia	106	12 (1,1%)
	Italia	810	495 (62%)

Positività per *Diplectanum aequans* delle spigole esaminate in base al sistema di allevamento e al paese di provenienza

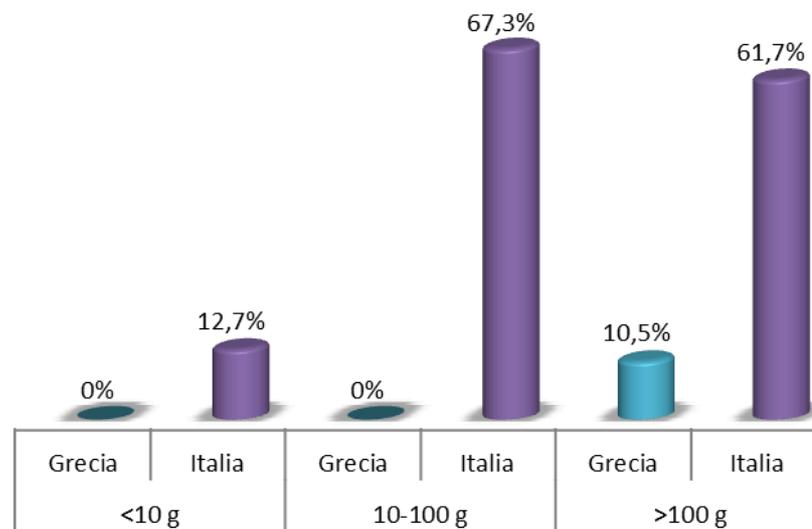


Percentuali di positività per *Diplectanum aequans* in spigola in base al sistema di allevamento (n.e.= non esaminati)

Per quanto concerne le percentuali di positività rilevate nelle diverse categorie di taglia, i valori sono schematizzati nella tabella e nel grafico seguenti.

<i>Diplectanum aequans</i>	Paese	Esaminati	Positivi (%)
<10 g	Grecia	69	0
	Italia	463	59 (12,7%)
10-100 g	Grecia	67	0
	Italia	456	307 (67,3%)
>100 g	Grecia	114	12 (10,5%)
	Italia	209	129 (61,7%)
Totale	Grecia	250	12 (4,8%)
	Italia	1128	495 (43,9%)

Positività per *Diplectanum aequans* delle spigole esaminate in base alla classe di taglia e al paese di provenienza

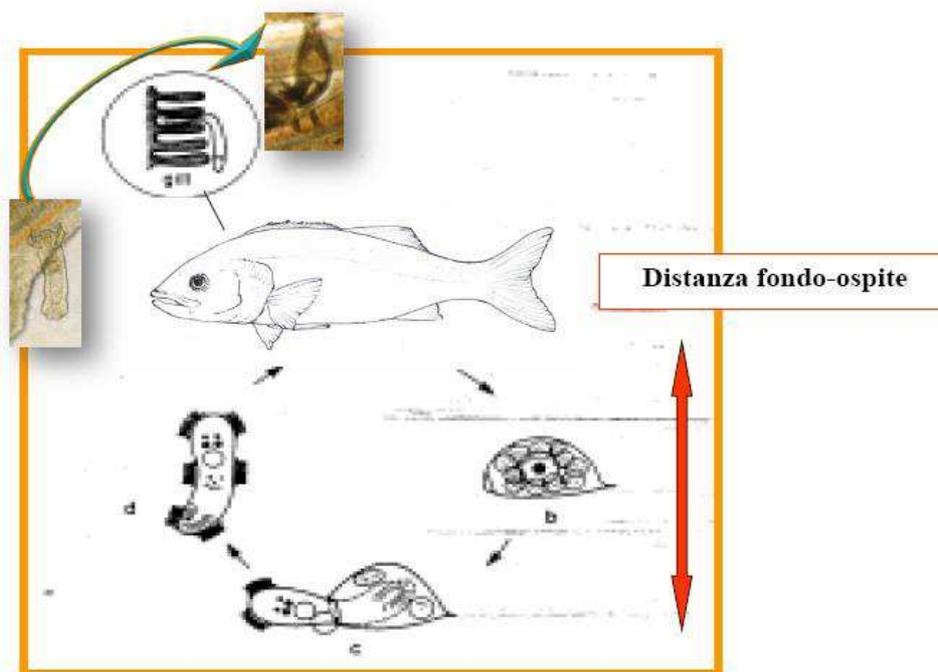


Positività per *Diplectanum aequans* delle spigole esaminate in base alla classe di taglia

Tra i dati di maggiore interesse va sottolineata la presenza di *Diplectanum aequans* con valori di positività elevati in Italia in tutti i sistemi di allevamento e più alti rispetto a quelli riportati da Fioravanti *et al.* (2006), mentre in Grecia risulta presente solo nei sistemi a terra. Quest'ultimo dato si discosta da pubblicazioni precedenti (Vagianou *et al.*, 2006) che riportavano positività del 76,9% e del 26,3% nei due allevamenti esaminati, rispettivamente in gabbia fuori costa e sotto costa.

In Italia questo monogeneo branchiale si conferma diffuso in tutte le tipologie d'allevamento considerate anche nei sistemi GFC e GSO dove, in rapporto al ciclo biologico di *D. aequans* che comprende una fase di sviluppo in cui le uova

emesse cadono sul fondo prima di fare emergere un oncomiracidio che, nuotando, raggiungerà un nuovo ospite, l'elevata distanza fondo-ospite dovrebbe essere sufficientemente breve da poter essere percorsa dagli stadi larvali infettanti.



Ciclo biologico (diretto) di *D. aequans*

In relazione all'intensità d'infestazione, *D. aequans* ha presentato valori molto diversi nelle diverse tipologie d'allevamento, con intensità basse (<20 parassiti/arco branchiale) in tutti i sistemi, intensità elevate (100-200) nei sistemi a terra e GSC e molto elevate (>200) solo negli allevamenti intensivi a terra.

All'esame necroscopico, nei soggetti parassitati da un numero relativamente basso di parassiti (<100/arco branchiale) non si osservavano evidenti stati di sofferenza branchiale, mentre nei soggetti maggiormente parassitati (diverse centinaia di parassiti/arco branchiale) si poteva osservare ispessimento dei filamenti, emorragie ed iperproduzione di muco.

EFFETTI PATOGENI SULL'OSPITE

All'esame istologico è stato possibile evidenziare iperplasia dell'epitelio delle lamelle primarie e spesso fusione delle lamelle secondarie, con infiammazione e foci emorragici intorno all'area d'attacco del parassita, che s'insinua tra le lamelle branchiali e aderisce alla base dei filamenti. L'iperplasia epiteliale a questo livello appare aumentata.

In alcuni casi si osserva la presenza di necrosi focali e desquamazione cellulare dell'epitelio ed ipertrofia ed iperplasia delle cellule mucipare.

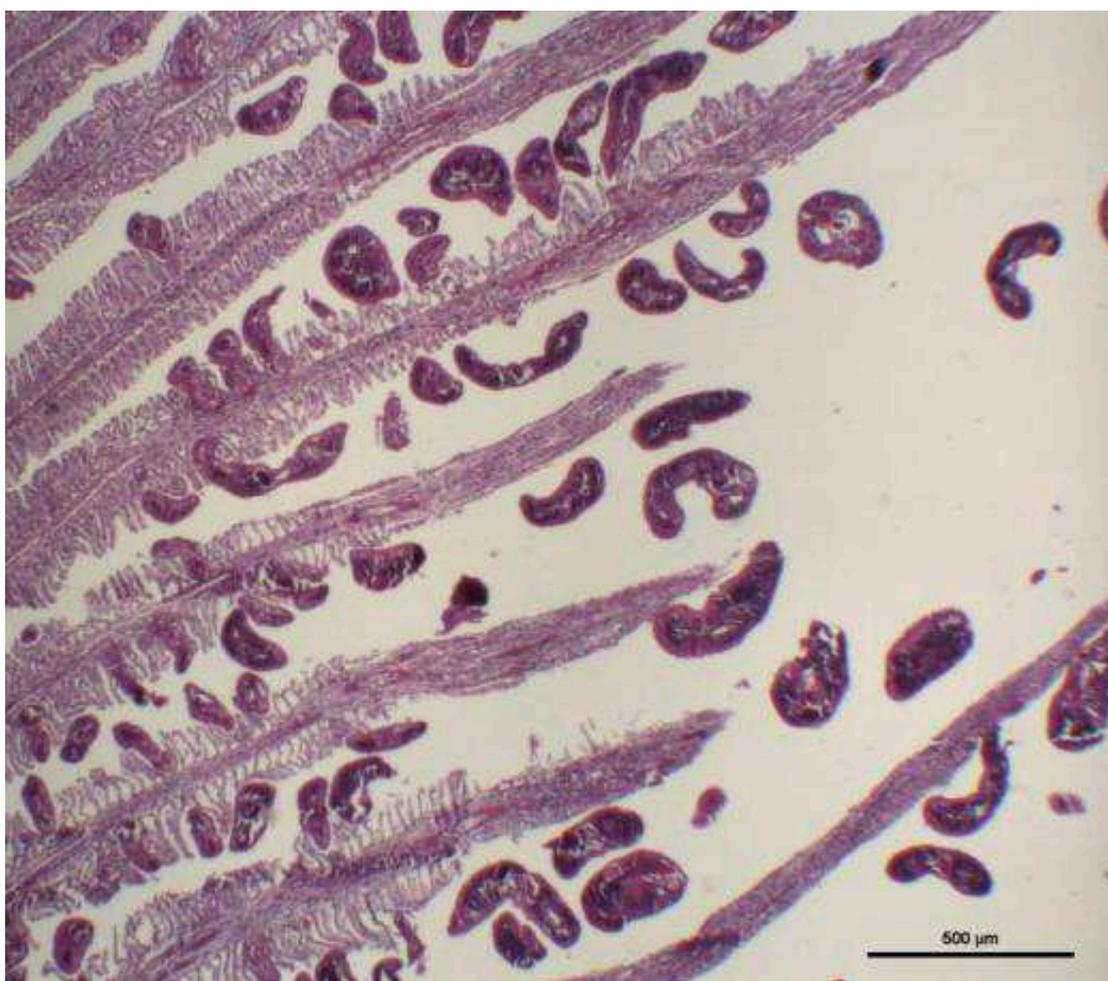
In qualche lesione si rilevava una chiara infiltrazione leucocitaria associata alla presenza di cellule eosinofile.

Dal punto di vista dell'azione patogena *D. aequans* rappresenta un parassita estremamente diffuso nel proprio ospite spigola e l'allevamento di questa specie ittica nel Mediterraneo probabilmente costituisce un serbatoio ideale per il mantenimento del parassita nell'ambiente. Se nelle spigole selvatiche infatti le intensità di infestazione sono generalmente basse (Sterud, 2002), in allevamento intensivo a terra e in gabbie sotto costa si verificano spesso episodi di mortalità anche gravi correlabili ad infestazioni massive di questo monogeneo (Alvarez-Pellittero *et al.*, 2004).

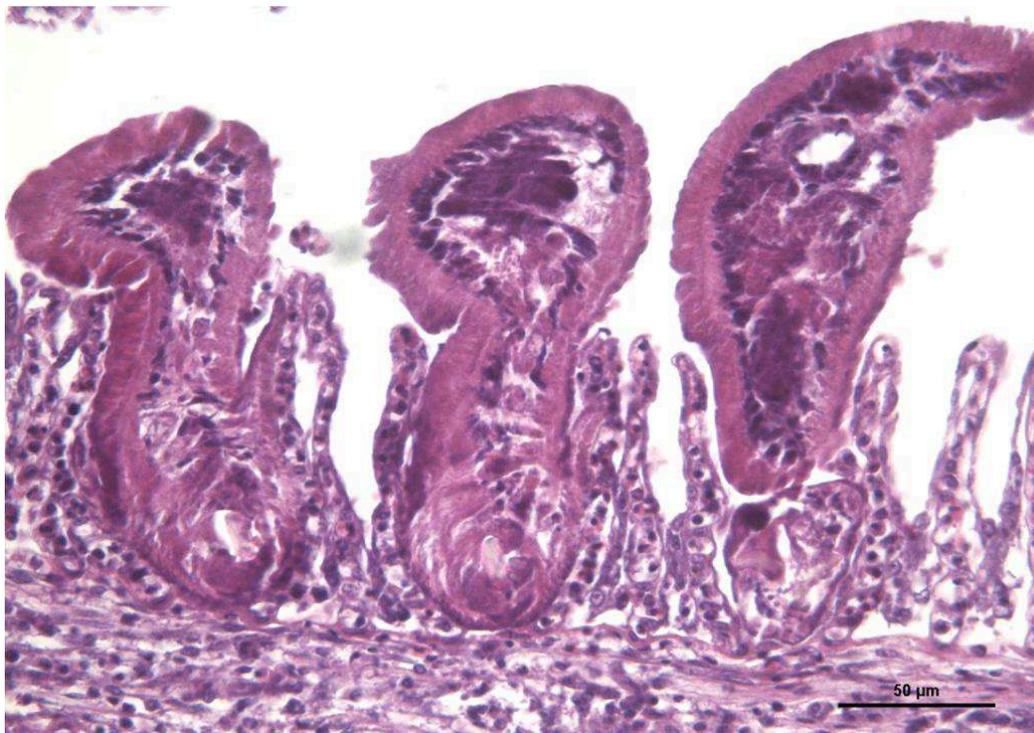
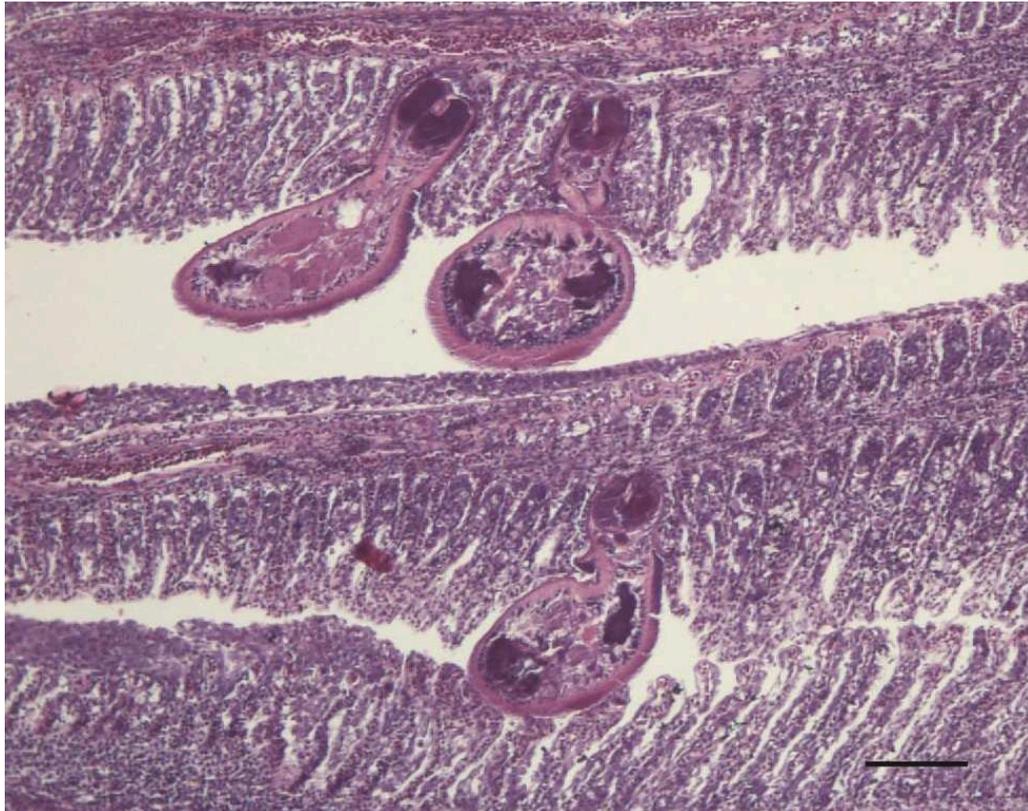
Analizzando alcuni soggetti (38) di *D. labrax* di circa 50 g di peso e provenienti da un allevamento intensivo a terra in Italia, Dezfuli *et al.* nel 2007 hanno condotto esami istopatologici nel tentativo di valutare l'effettiva patogenicità di *D. aequans*. A livello clinico i pesci erano in buono stato di salute ad eccezione di 3 soggetti che mostravano apatia, ipersecrezione mucosa ed ipertrofia degli apici delle lamelle branchiali. Ventotto (73,6%) dei 38 esemplari esaminati risultavano positivi per *D. aequans* all'esame microscopico. All'istologia i parassiti risultavano profondamente infissi nella lamella primaria causando distruzione di quella secondaria ad opera soprattutto degli hamuli nell'opisthaptor e determinando una lieve reazione flogistica che solo in casi di infestazione massiva sembra poter avere un significato patogenetico importante.



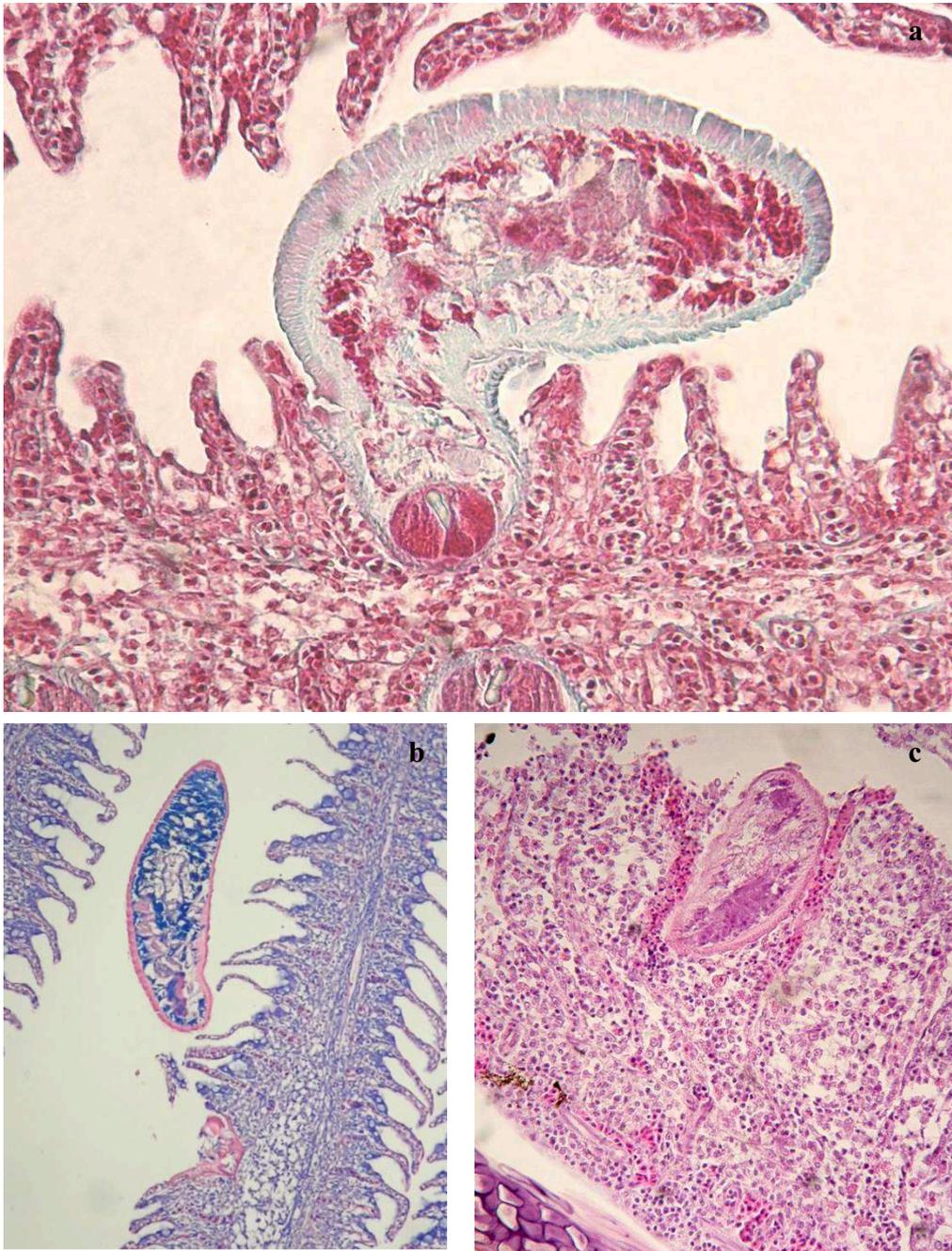
Branchie di spigola in necrosi in seguito ad infestazione massiva da *Diplectanum aequans* (a sinistra); particolare dell'apparato di adesione (squama disco) nell'opisthaptor di *D. aequans*



Branchie di spigola con infestazione massiva da *Diplectanum aequans* (a sinistra) (EE, 4×); esemplare di *D. aequans* infisso tra le lamelle branchiali (Giemsa, 40×)



Branchie di spigola: infestazioni massive (superiori ai 100 parassiti/arco branchiale) con grave iperplasia ed edema delle lamelle e frequente fusione dei filamenti, infiltrazione linfocitaria e granulocitaria perivascolare a livello del filamento.



D. aequans tra filamenti branchiali di spigola con vari gradi di lesione, da lieve (a, Gram, 40×; b, Giemsa 10×) a grave iperplasia epiteliale con congestione vasale (c, EE, 10×)

CERATOTHOA OESTROIDES

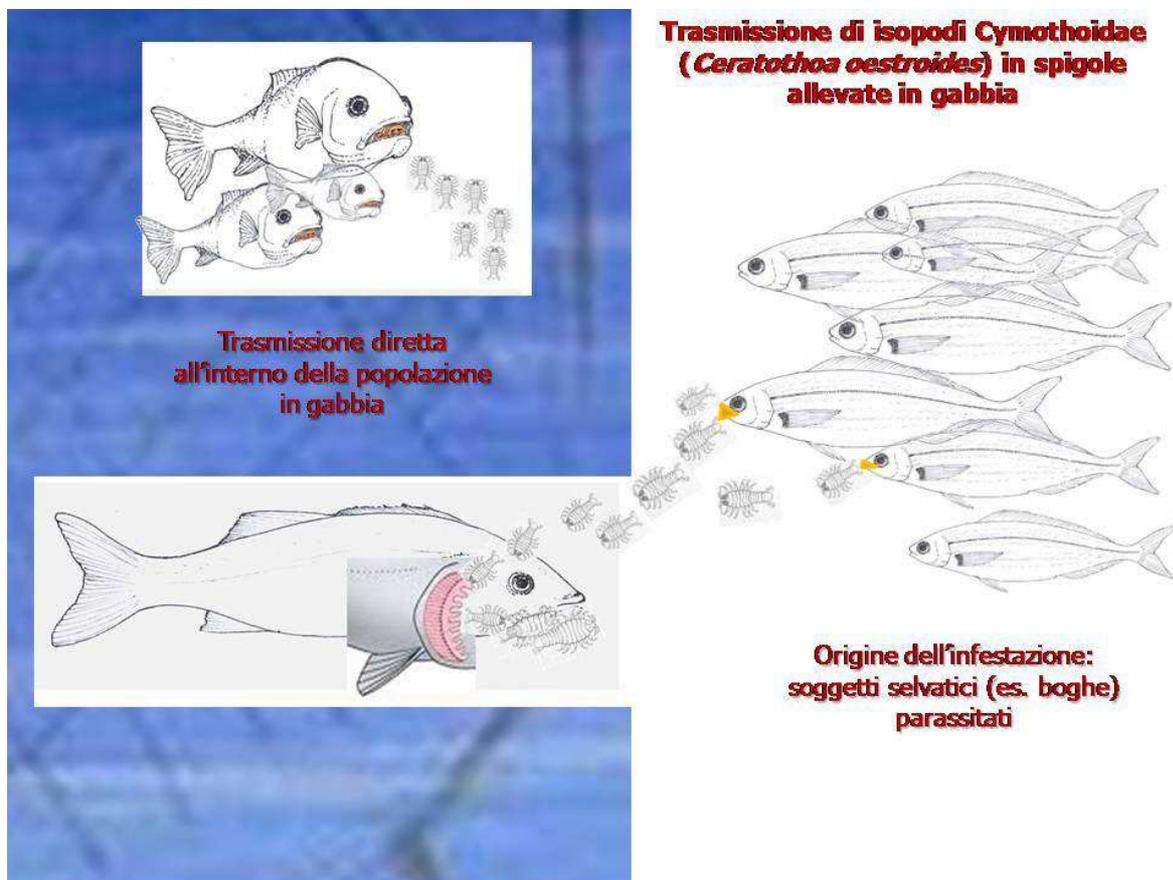
Gli isopodi sono crostacei con corpo appiattito in senso dorso-ventrale. Sono Malacostraci quindi privi di carapace, il loro corpo è costituito da sette segmenti toracici liberi ognuno dei quali è provvisto di un paio di arti, il corpo è fuso con il primo segmento toracico a formare il cefalotorace e porta le prime antenne corte (antennule) e le seconde antenne lunghe; gli occhi non sono penduncolati. I primi cinque segmenti addominali sono distinti, di piccole dimensioni e l'ultimo forma una lamina caudale molto sviluppata.

Il genere *Ceratothoa*, in modo particolare *Ceratothoa oestroides* (Risso, 1826), da adulto ha come sede definitiva la cavità orale dell'ospite. I membri di queste

famiglie sono ermafroditi proterandrici, il che significa che gli individui si sviluppano all'inizio come maschi e successivamente diventano femmine. Le uova vengono deposte dalle femmine, costantemente fertile durante tutto l'anno, nel suo marsupio posto sulla superficie ventrale, qui schiudono e diventano larva "pullus". Le larve *pulli* vanno incontro a diverse mute prima di diventare forme libere infettanti per altri pesci. La differenziazione sessuale avviene dopo che l'ultimo stadio di larva *pullus* ha lasciato il marsupio. A questo punto le larve *pulli* prendono il nome di larve *manca*. Queste nuotano attivamente alla ricerca dell'ospite, di solito alla base della coda o ai fianchi, il tempo necessario dal momento dell'attacco sull'ospite al trasferimento nella cavità boccale è di due ore. Le larve *pulli* competono attivamente per raggiungere



la cavità orale dell'ospite e solo due individui sono in grado di insediarsi, anche se all'inizio il pesce può essere attaccato da numerosi parassiti sulla cute, all'occhio, sulla testa e sugli opercoli, sui fianchi al di sopra della linea laterale, sulla pinna caudale e sul peduncolo caudale e solo due di questi saranno in grado di insediarsi nella sede definitiva. Alla temperatura di 22°C, le larve infettanti libere rimangono vitali e in grado di attaccare gli ospiti per circa 7 giorni. Dopo l'insediamento nella cavità boccale i parassiti sono incapaci di cambiare ospite, perché ormai sono diventati ematofagi.



Ciclo biologico di *Ceratothoa oestroides*

La distribuzione degli isopodi del genere *Ceratothoa* si estende in tutto il bacino del Mediterraneo, dell'Atlantico orientale fino alle coste del Marocco e nel mar Nero ed è strettamente correlata alla presenza e alla ecologia degli ospiti. I pesci di fondo delle acque costiere sono quelli più frequentemente

colpiti, mentre più rare sono le infezioni nei pesci che vivono a grandi profondità o nei pesci migratori. Fra i più colpiti sono i membri delle famiglie Sparidae, Lutianidae, Trichiuridae e Bramidae. Gli allevamenti intensivi lungo le coste del mediterraneo costituiscono un ambiente ideale per lo sviluppo degli isopodi che rappresentano un problema ricorrente negli allevamenti di orata e soprattutto di spigola (Sarusic, 1999; Charfi-Cheikhrouha *et al.*, 2000).

Tra i fattori che determinano l'infezione da *Ceratothoa oestroides* la temperatura rappresenta quello più importante (Sarusic, 1999; Charfi-Cheikhrouha *et al.*, 2000) con maggiore incidenza a Luglio e Settembre secondo le ricerche svolte da Horton & Okamura (2001) e con maggior prevalenza durante la primavera secondo Mladineo (2002), mentre durante l'inverno sembra ci sia un calo delle infestazioni.

Ceratothoa oestroides è diventata uno dei maggiori problemi parassitari nelle isole egee orientali soprattutto nelle spigole ma anche nelle orate allevate in ambienti circoscritti da reti.

Nel corso della nostra indagine solo 2 soggetti di spigola allevati in gabbia sono risultati positivi per la presenza di *C. oestroides* con una positività del 2,5% e lo stato di nutrizione appariva comunque buono.

Attualmente in Grecia comunque la parassitosi è ben conosciuta e diffusa, creando non pochi problemi agli allevatori (Rigos com. pers.).

Le infezioni gravi da forme larvali che attaccano i pesci alla ricerca della sede definitiva possono portare a morte i soggetti più giovani. Le larve pulli e le forme giovanili attaccano i soggetti relativamente giovani e sono causa di danni rilevanti alla cute intorno alla testa, gli occhi e le branchie danneggiando anche la struttura delle lamelle. I pesci colpiti appaiono apatici e anoressici e possono presentare sintomi di insufficienza respiratoria. La presenza di aree di tessuto emorragico e necrotico è evidente all'osservazione attenta degli animali. Inoltre la presenza del parassita femmina nel cavo orale causa atrofia della lingua, displasia dentaria e deformazione dei tessuti cartilaginei nella mandibola che assume una tipica forma "a sacchetto". Ovviamente la presenza di questi grossi parassiti in cavità orale interferisce con la normale attività alimentare causando

uno stato di stress cronico, con conseguente ritardo della crescita e predisposizione ad altre infezioni batteriche e parassitarie (Mladineo, 2003; Vagianou *et al.*, 2009).

La prevenzione si basa essenzialmente su misure di gestione degli stock. L'eccessiva densità di pesce nei recinti deve essere evitata. Spesso nei casi di parassitismo e mortalità la riduzione della biomassa in gabbia può essere sufficiente per porre rimedio alla situazione. In aggiunta sarebbe meglio evitare la stretta vicinanza tra soggetti giovani e adulti, preferire i siti profondi con correnti sufficientemente forti da disperdere i parassiti giovanili lontano dal corpo principale dell'ormeggio della gabbia.

Vale la pena notare che negli allevamenti in cui si fa vaccinazione di routine c'è un calo del numero di isopodi allo stadio larvale che aggrediscono i pesci e anche gli adulti, con l'utilizzo dell'anestetico pre-vaccinazione, perdono la loro presa sull'ospite e cadono ancora vivi.

Per quanto riguarda il controllo della parassitosi c'è una mancanza di dati sperimentali nel Mediterraneo.

Gli esperimenti di laboratorio con deltametrina (piretroidi) hanno indicato che il minimo della dose in vitro che uccide gli adulti di *Ceratothoa oestroides* in 2 ore è 0,05mg/l. Dati di campo sperimentali dal produttore di AlphamaxTM in gabbie off-shore di spigole indicano che deltametrina a 3ppb per 30 minuti è efficace e sicura per il trattamento delle spigole di piccole dimensioni (<10g) contro i giovanili del parassita, mentre con gli adulti di *Ceratothoa* funziona a dosi di 7,5ppb per 30 minuti. I prodotti a base di piretroidi, non autorizzati per l'acquacoltura, presentano alcuni svantaggi importanti: sono costosi se acquistati in grandi volumi e per l'uso ripetuto, sono rischiosi per i pesci, non impediscono il manifestarsi di recidive di infestazione, la qualità del prodotto finale può risentire dall'utilizzo prolungato sia dal punto di vista organolettico che dell'immagine del prodotto di acquacoltura (Athanassapolou *et al.*, 2001).

ORATA

Sparus aurata

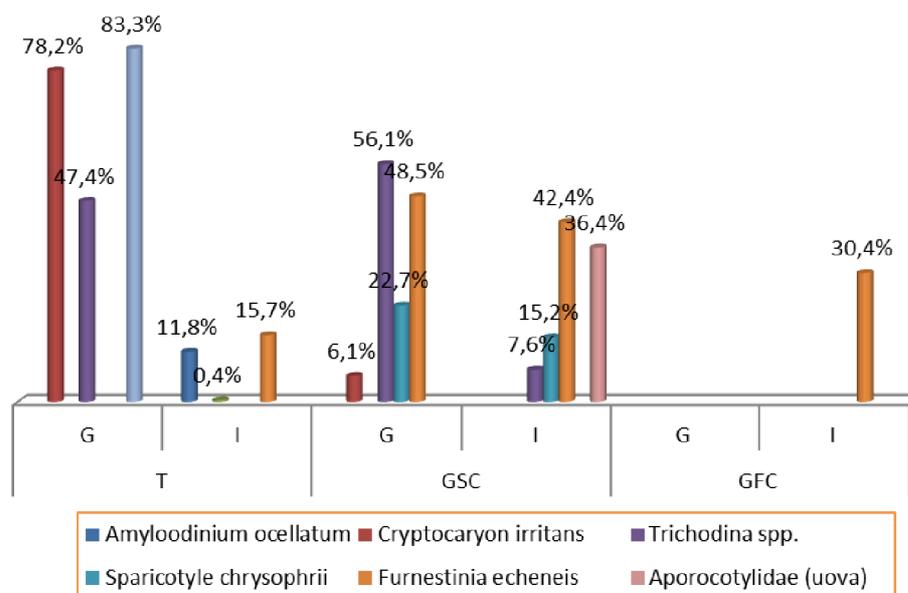


La presenza di ectoparassiti è stata riscontrata in 211 (45,7%) delle 462 orate esaminate.

Nella tabella e nel grafico seguente vengono riportate le specie di ectoparassiti riscontrate in orata nel corso dell'indagine, indicando il numero di soggetti positivi e le percentuali di positività osservate in relazione alla tipologia d'allevamento ed al paese preso in considerazione (Grecia, G e Italia, I).

Orata N. positivi (%)	T		GSC		GFC	
	G	I	G	I	G	I
<i>Amyloodinium ocellatum</i>	0	27 (11,8%)	0	0	0	0
<i>Cryptocaryon irritans</i>	68 (78,2%)	1 (0,4%)	4 (6,1%)	0	0	0
<i>Trichodina</i> spp.	37 (47,4%)	0	37 (56,1%)	5 (7,6%)	0	0
<i>Sparicotyle chrysophrii</i>	0	0	15 (22,7%)	10 (15,2%)	0	0
<i>Furnestinia echeneis</i>	65 (83,3%)	36 (15,7%)	32 (48,5%)	28 (42,4%)	0	7 (30,4%)
Aporocotylidae (uova)	0	0	0	24 (36,4%)	0	0

Numero di pesci positivi e prevalenza per le diverse specie di ectoparassiti riscontrati nelle orate esaminate nelle diverse tipologie d'allevamento prese in considerazione in Grecia (G) e Italia (I).

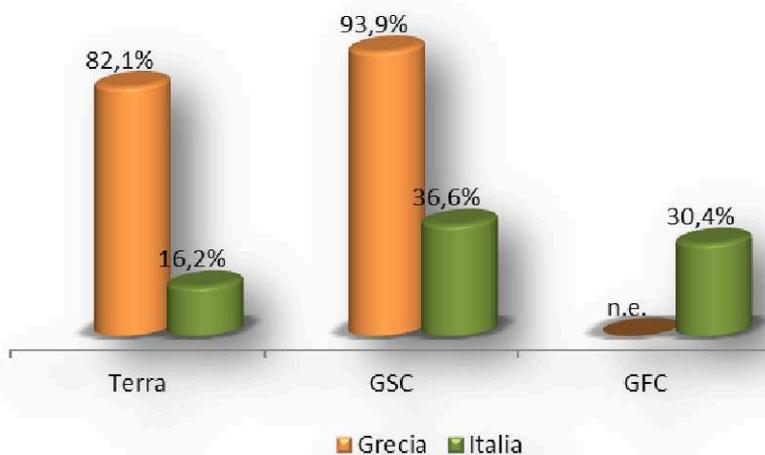


Positività di *Sparus aurata* per le diverse specie di ectoparassiti reperiti nei diversi sistemi di allevamento in Grecia ed in Italia

Nella tabella seguente vengono indicati i soggetti di orata positivi per la presenza di ectoparassiti in Grecia e Italia in base al sistema d'allevamento.

Orata	Grecia N. positivi/esaminati (%)	Italia N. positivi/esaminati (%)	Totale
Terra	64/78 (82,1%)	37/229 (16,2%)	101/307 (32,9%)
Gabbia Sotto Costa	62/66 (93,9%)	42/66 (36,6%)	104/132 (78,8%)
Gabbia Fuori Costa	-	7/23 (30,4%)	7/23 (30,4%)
Totale Gabbia	62/66 (93,9%)	49/89 (55,1%)	111/155 (71,6%)
Totale	126/144/ (87,5%)	86/318 (27%)	212/462 (45,8%)

Percentuali di positività per ectoparassiti riscontrate nelle orate esaminate in relazione alla tipologia d'allevamento e paese (Grecia e Italia).

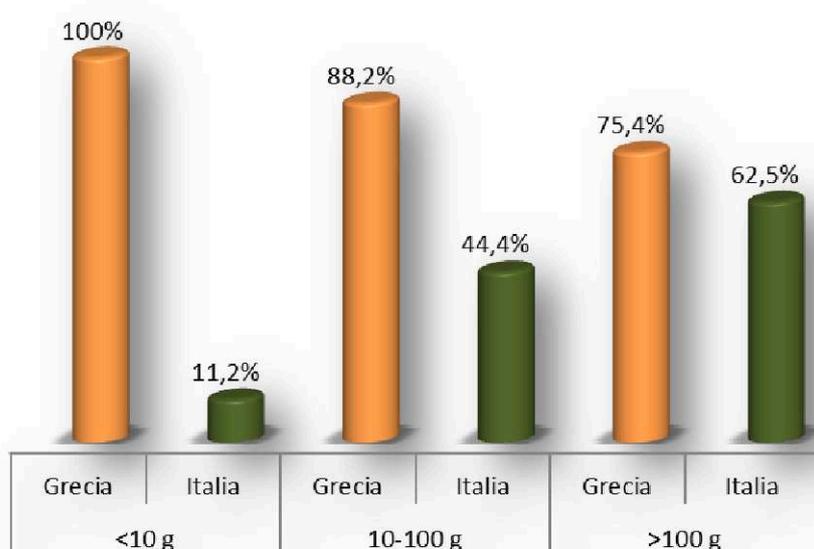


Percentuali di positività per ectoparassiti in orata in base al sistema di allevamento in Grecia ed in Italia

Per quanto concerne le percentuali di positività per parassiti osservate nelle diverse categorie di taglia delle orate esaminate, i valori sono schematizzati nella tabella e nel grafico seguenti.

Categoria di taglia	Paese	Esaminati	Positivi
<10 g	Grecia	53	53 (100%)
	Italia	232	26 (11,2%)
10-100 g	Grecia	34	30 (88,2%)
	Italia	27	12 (44,4%)
>100 g	Grecia	57	43 (75,4%)
	Italia	32	20 (62,5%)
Totale	Grecia	144	126 (87,5%)
	Italia	291	58 (19,9%)

Percentuali di positività per ectoparassiti riscontrate nelle diverse categorie di taglia delle orate esaminate in Grecia e Italia.



Percentuali di positività per ectoparassiti in orate in base alle diverse categorie di taglia

In base ai dati quantitativi ottenuti si può evidenziare che la composizione della fauna ectoparassitaria delle orate allevate in Grecia è piuttosto diversa rispetto a quella delle orate allevate in Italia, ovvero vi sono specie parassitarie in un paese che nell'altro sono praticamente assenti (i.e. *C. irritans*, *A. ocellatum* e le uova dei digenei Aporocotylidae) mentre ad esempio i monogenei branchiali sono un reperto costante in entrambi i paesi, indice di una minore selettività di questi ultimi dal punto di vista ambientale rispetto alle altre

specie isolate. Nel suo complesso la parassitofauna di *Sparus aurata* nei due paesi risulta sovrapponibile a quanto già riportato in letteratura (Fioravanti *et al.*, 2006; Vagianou *et al.*, 2006).

I dati quantitativi degli ectoparassiti in base al sistema d'allevamento indicano che in Grecia non sembra ci siano differenze sostanziali tra i sistemi a terra e le gabbie sottocosta, mentre in Italia i sistemi a terra sembrerebbero offrire un ambiente meno favorevole alla diffusione di queste parassitosi. Anche per quanto riguarda le categorie di taglia le orate esaminate dai due paesi mostrano un andamento opposto, con positività maggiori in Grecia per i soggetti <10g e minori per i soggetti > 100g e viceversa in Italia, probabilmente in conseguenza di una diversa gestione della biomassa nei due paesi che può influenzare enormemente la diffusione di ectoparassiti a ciclo diretto quali quelli isolati nel corso di questa indagine. Vengono qui di seguito presentate le schede descrittive relative alle diverse specie di ectoparassiti riscontrate nelle orate esaminate in Grecia e Italia, con illustrazione delle differenze significative osservate in relazione a tipologia d'allevamento, categoria di taglia e paese di provenienza, nonché con le osservazioni relative agli effetti patogeni sull'ospite.

AMYLOODINIUM OCELLATUM

Per quanto concerne lo stato delle conoscenze su *Amyloodinium ocellatum*, si rimanda a quanto già riportato nel capitolo dei risultati relativo alla spigola.



ANALISI DESCRITTIVA DEI RISULTATI

A. ocellatum è stato reperito complessivamente in 27 (5,8%) delle 462 orate esaminate e solo in soggetti provenienti dall'Italia e da sistemi d'allevamento intensivo a terra, come schematizzato nella tabella nella pagina successiva.

Questo dato è facilmente spiegabile tenendo conto del ciclo biologico di questo parassita che, necessitando di uno stadio di sviluppo obbligato sul

fondo, trova negli impianti a terra con basso ricambio idrico e una distanza ravvicinata tra fondo e ospite pesce, un ambiente ideale per svilupparsi e colonizzare il pesce allevato. Indagini recenti hanno inoltre cercato di correlare la presenza e l'intensità di infestazione di *A. ocellatum* in *S. aurata* allevata con i fattori abiotici usualmente presenti in allevamento, tra cui la salinità sembra rappresentare il più importante parametro d'influenza (Pereira *et al.*, 2011) assieme alla temperatura.

<i>Amyloodinium ocellatum</i>	Paese	Esaminati	Positivi (%)
Terra	Grecia	78	0
	Italia	229	27 (11,8%)
GSC	Grecia	66	0
	Italia	66	0
GFC	Grecia	0	0
	Italia	23	0
GSO	Grecia	0	0
	Italia	0	0
Estensivo	Grecia	0	0
	Italia	0	0
Totale	Grecia	144	0
	Italia	318	27 (8,5%)

Positività per *A. ocellatum* delle orate esaminate in base al sistema di allevamento e al paese di provenienza

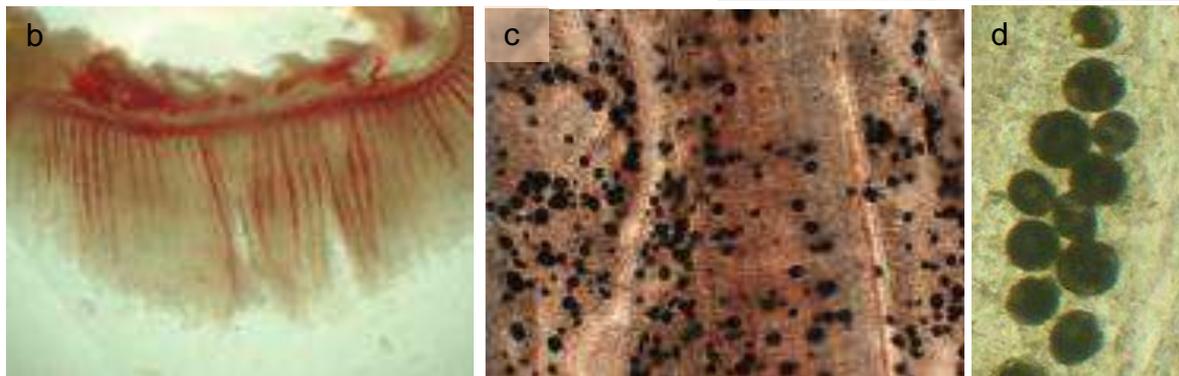
In relazione alla categoria di taglia, *A. ocellatum* è stato osservato solo in soggetti di peso <10g e compreso tra 10 e 100g, come illustrato nella tabella e nel grafico seguente. Queste sono le taglie che dal punto di vista immunitario sono maggiormente suscettibili nei confronti di ectoparassiti come *A. ocellatum* (Kuperman & Matey, 1999).

<i>Amyloodinium ocellatum</i>	Paese	Esaminati	Positivi (%)
<10 g	Grecia	53	0
	Italia	232	19 (8,2%)
10-100 g	Grecia	34	0
	Italia	39	8 (20,5%)
>100 g	Grecia	57	0
	Italia	47	0
Totale	Grecia	144	0
	Italia	318	27 (8,5%)

Positività per *A. ocellatum* delle orate esaminate in base alla classe di taglia e al paese di provenienza

EFFETTI PATOGENI SULL'OSPITE

Nel corso della nostra indagine si sono verificati alcuni episodi di mortalità estremamente gravi in orate di piccola taglia (<10g) allevate in vasche a terra.

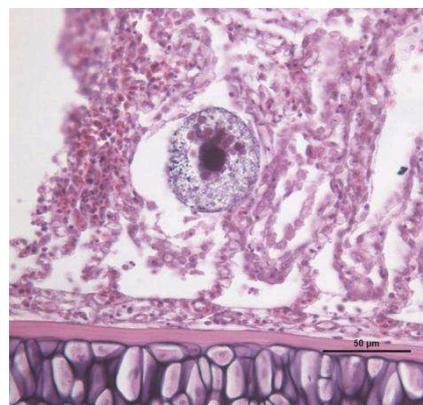


Orate con grave anemia branchiale e presenza di filamenti emorragici (a, b) che all'esame microscopico a fresco rilevavano un'infestazione massiva da *A. ocellatum* con migliaia di trofonti a diverso stadio di sviluppo (c, d)

Clinicamente gli animali morivano con atteggiamento asfittico a decorso iperacuto tale da far sospettare inizialmente una noxa patogena di tipo tossico. L'esame necroscopico metteva poi in evidenza nei soggetti esaminati la presenza di branchie nel complesso gravemente anemiche con filamenti branchiali frequentemente emorragici.

Già a basso ingrandimento era possibile individuare allo stereomicroscopio gli stadi maturi (trofonti) riconducibili ad *Amyloodonium ocellatum*, diagnosi poi facilmente confermata all'esame microscopico a fresco dei filamenti branchiali infestati da migliaia di stadi del parassita.

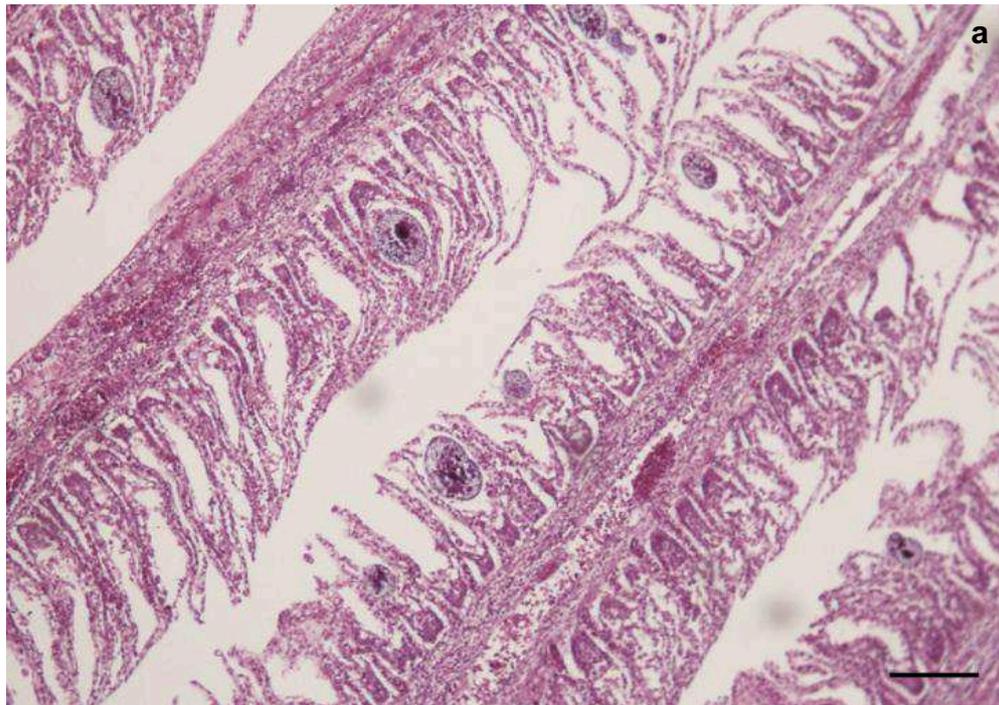
Gli esami istopatologici condotti su alcune orate massivamente parassitate (>50



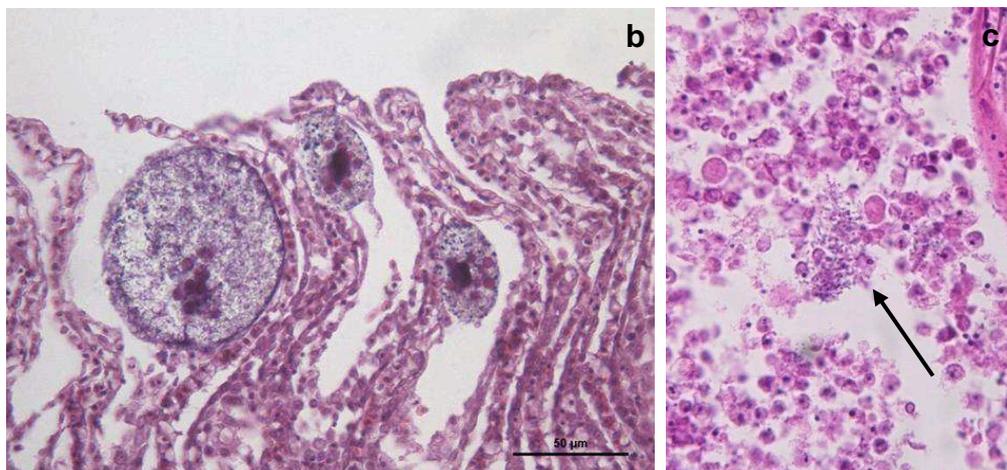
Trofonte di *A. ocellatum*

trofonti/filamento branchiale) evidenziavano una gravissima iperplasia dell'epitelio branchiale con pressoché totale fusione delle lamelle, necrosi, sfaldamento cellulare ed emorragie. Si osservava inoltre congestione dei vasi dei filamenti branchiali.

I parassiti si presentavano a diverso stadio di sviluppo fino allo stadio di trofante maturo.



Trofanti di *A. ocellatum* a vario stadio di sviluppo (a, EE, 10×). Si osserva iperplasia branchiale con necrosi e desquamazione dell'epitelio respiratorio in presenza di *A. ocellatum* e colonie batteriche (freccia) (b, c) (EE, 40×, 100×).



Ad intensità d'infezione più basse (1-2 trofonti/filamento branchiale) il quadro istopatologico si dimostrava di minore gravità con edema e lieve iperplasia branchiale.

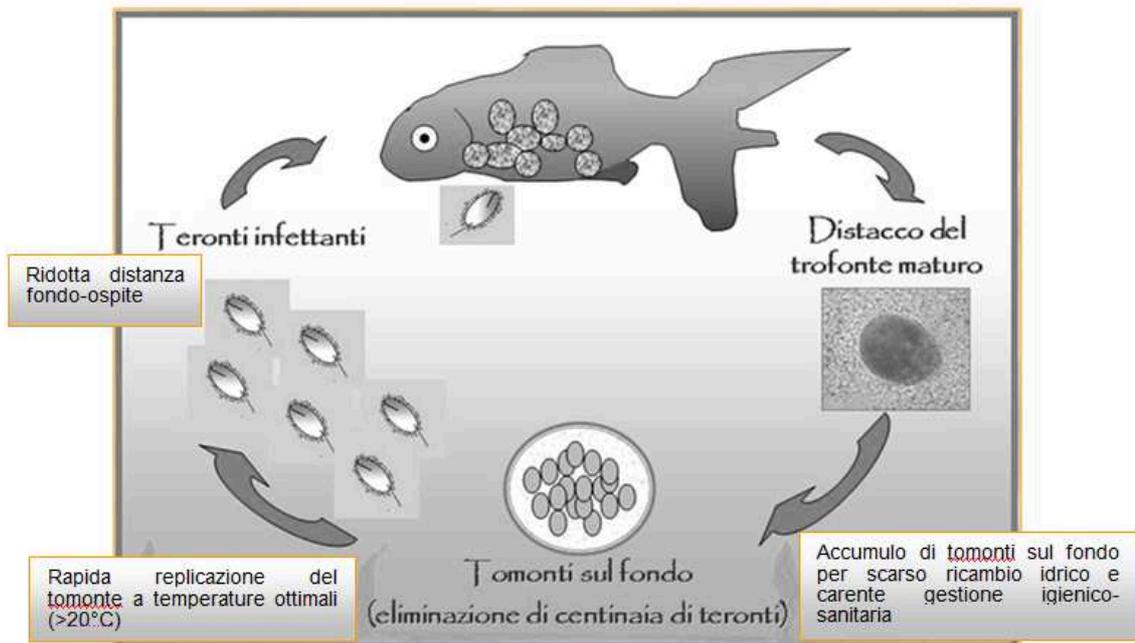
Le lesioni osservate nel corso di questi episodi risultano sostanzialmente in linea con quanto descritto in letteratura (Brown, 1934; Paperna, 1980; Noga & Levy, 1995), confermando l'elevata patogenicità di *A. ocellatum* nel caso di infestazioni ad elevata intensità.

CRYPTOCARYON IRRITANS

La criptocarionosi o “malattia dei puntini bianchi” è una malattia protozoaria dei pesci marini considerata uno dei maggiori problemi parassitari della maricoltura praticata in areali tropicali, sub-tropicali e temperati (Cheung *et al.*, 1981; Colorni, 1985; Jee *et al.*, 2000). L'agente



eziologico è rappresentato da *Cryptocaryon irritans*, un ciliato in grado di parassitare un ampio range di pesci marini (Burgess & Matthews, 1995). Durante il ciclo vitale passa da uno stadio parassitario obbligato, il trofante, rotondeggiante e con diametro di 60-450 μm , ad uno stadio di riproduzione libero, il tomonte (Nigrelli & Ruggeri, 1966; Colorni, 1987; Colorni & Diamant, 1993; Matthews *et al.*, 1993). Quando maturo, il trofante lascia il pesce sotto forma di tomonte e si circonda di una cisti all'interno della quale, per divisione multipla, si formano 200 o più tomiti. Questi ultimi schiudono dalla cisti come teronti che rappresentano gli elementi infettanti in grado di penetrare l'epitelio cutaneo e branchiale dell'ospite (Dickerson & Dawe, 1995).



Ciclo biologico di *Cryptocaryon irritans* e fattori predisponenti l'insorgenza della malattia

Il trofante di *C. irritans* ha un macronucleo lobato e diversi piccoli micronuclei (Colorni & Diamant, 1993); il macronucleo ha 4 lobi disposti a “mezza luna” (Wilke & Gordin, 1969), ciascuno dei quali ha approssimativamente una lunghezza di 10 μm e una larghezza di 8 μm e contiene 1 o 2 nucleoli (Colorni & Diamant, 1993). Nel tomonte i 4 lobi del macronucleo si fondono insieme poco prima che esso inizi a dividersi per *budding*: una porzione di citoplasma contenente una porzione del macronucleo si formerà ad un'estremità della cellula, iniziando subito a dividersi in due cellule di uguale grandezza. Il processo si ripeterà fino a che un numero di tomiti di uguale grandezza verranno prodotti all'interno della cisti riproduttiva. Nel contempo i micronuclei proliferano per divisione mitotica in numero di 5 o 7 ed iniziano a distribuirsi in ciascuna cellula figlia (Colorni & Diamant, 1993).

L'apparato boccale del parassita è costituito da un singolo anello di cirri, ciascuno dei quali composto da 2 cilia adiacenti, posto intorno all'apertura orale di circa 20 μm di diametro (Cheung *et al.*, 1981). Secondo alcuni Autori questo anello è usato per scavare nell'epitelio e “grattare” le cellule a scopo trofico. Inoltre nella cavità buccale sono presenti due membrane che hanno

probabilmente la funzione di assorbire muco, sangue e detriti cellulari (Nigrelli & Ruggeri, 1966). Il parassita è dotato infine di “mucocisti” che possono entrare in gioco nell’invasione dell’ospite (Colorni & Diamant, 1993; Matthews *et al.*, 1993) e ciglia che gli conferiscono un movimento rotatorio lento (Dickerson & Dawe, 1995).

La temperatura di crescita ottimale per questo parassita è di 23-30°C (Colorni, 1985; Burgess & Matthews, 1994; Yoshinaga & Dickerson, 1994) e ciò spiega perchè le epizoozie si sviluppano in genere in acque con temperature superiori a 19°C. Sebbene possa interessare moltissime specie ittiche marine, nella maricoltura mediterranea gli spardi risultano particolarmente suscettibili (Rigos *et al.*, 2001).

La sintomatologia dipende dall’intensità d’infezione e si può manifestare in forma grave con iperproduzione di muco, difficoltà respiratorie, presenza sul corpo di formazioni puntiformi biancastre. I trofonti possono determinare gravi erosioni a livello dell’epitelio branchiale e cutaneo, con conseguenti infezioni secondarie (Nigrelli & Ruggeri, 1966; Wilke & Gordin, 1969; Yoshinaga & Dickerson, 1994; Huff & Burns, 1981). Inoltre possono colonizzare anche la cornea, provocando gravi cheratiti fino a cecità. Nelle gravi infezioni la mortalità può risultare elevata (Bruno *et al.*, 1997).

Fattori abiotici, quali *in primis* la salinità e la temperatura dell’acqua, possono poi condizionare l’insorgenza di malattia favorendo la replicazione del parassita e accorciando i tempi necessari allo stadio parassitario sull’ospite per raggiungere lo stadio di trofonte maturo e abbandonare quindi l’ospite come tomonete per andare a replicare sul fondo.

Il sospetto diagnostico può essere avanzato sulla base dei sintomi e dalle lesioni, ma va sempre confermato mediante individuazione del parassita in raschiati cutanei e branchiali sottoposti ad osservazione microscopica a fresco. Il trofonte viene individuato ed identificato facilmente grazie alle sue dimensioni, al suo lento movimento rotatorio ed alla presenza di un nucleo costituito da 4 lobature disposte a “mezza luna” (Bruno *et al.*, 1997).

ANALISI DESCRITTIVA DEI RISULTATI

Questo ciliato è stato osservato in 73 (15,8%) delle 462 orate esaminate.

Nel corso della nostra ricerca abbiamo riscontrato la presenza di *C. irritans* solo in orata, a conferma dell'estrema suscettibilità di questa specie al parassita, come già descritto da Colorni (1985).

Tutti i soggetti positivi sono stati riscontrati in allevamenti intensivi a terra in Grecia (64 pesci su 78 esaminati con una positività di 82,1%), ad eccezione di un riproduttore di orata allevato a terra in Italia e 4 (6,1%) soggetti allevati in gabbia galleggiante sotto costa in Grecia, come illustrato nella tabella seguente.

<i>Cryptocaryon irritans</i>	Paese	Esaminati	Positivi (%)
Terra	Grecia	78	64 (82,1%)
	Italia	229	1 (0,4%)
GSC	Grecia	66	4 (6,1%)
	Italia	66	0
GFC	Grecia	0	0
	Italia	23	0
GSO	Grecia	0	0
	Italia	0	0
Estensivo	Grecia	0	0
	Italia	0	0
Totale	Grecia	144	68 (47,2%)
	Italia	318	1 (0,3%)

Positività per *C. irritans* delle orate esaminate in base al sistema di allevamento e al paese di provenienza

La presenza di *C. irritans* quasi esclusivamente legata ai sistemi a terra si può ricondurre al ciclo biologico del parassita che, essendo legato obbligatoriamente allo sviluppo di una fase bentonica (lo stadio di tomonte), trova in questa tipologia d'allevamento un ambiente ideale, a causa della limitata distanza che separa solitamente l'ospite pesce dal fondo della vasca e che ne facilita il raggiungimento da parte degli stadi infettanti. Inoltre gli allevamenti a terra sono spesso caratterizzati da uno scarso o comunque difficoltoso ricambio idrico che facilita la permanenza di tutti gli stadi "ambientali" di *C. irritans* nel sistema.

In particolare questo parassita sembra rappresentare un vero fattore limitante l'allevamento dell'orata in impianti a terra in Grecia (Rigos com. pers.) ed è risultato particolarmente "fastidioso" nell'impianto a ricircolo sperimentale dove,

nonostante non abbia causato picchi di mortalità, ha fortemente limitato le performances delle orate stabulate e predisposto all'insorgenza di infezioni batteriche secondarie responsabili in un secondo momento di un aumento della mortalità.

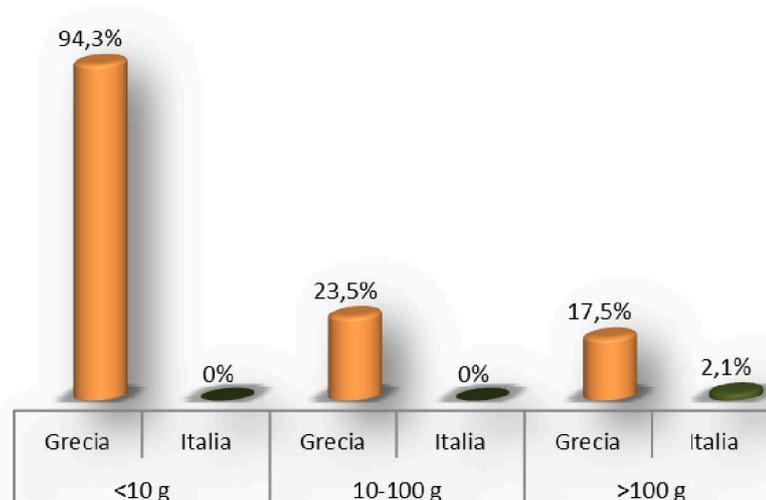
Per quanto concerne le categorie di taglia maggiormente colpite, *C. irritans* è stato osservato in Grecia rispettivamente in 51 (94,3%) soggetti di peso <10g, in 8 (23,5%) soggetti di peso compreso tra 10 e 100g e in 10 (17,5%) soggetti di peso >100g, come schematizzato nella tabella seguente e nel grafico della pagina successiva.

Nei soggetti da noi esaminati si sono sempre osservate intensità d'infezione medio-alte (>5 trofonti/filamento branchiale) nei soggetti di taglia <10g e 10-100g, mentre i soggetti di taglia >100g hanno sempre presentato infestazioni di bassa intensità.

I risultati ottenuti sembrano confermare una maggiore suscettibilità dei pesci di piccola taglia probabilmente dovuta ad uno stato immunitario non ancora perfettamente sviluppato e ad una maggiore sensibilità agli stress imposti dalle pratiche d'allevamento che possono aggravare il quadro di immunodepressione predisponente all'infezione.

<i>Cryptocaryon irritans</i>	Paese	Esaminati	Positivi (%)
<10 g	Grecia	53	50 (94,3%)
	Italia	232	0
10-100 g	Grecia	34	8 (23,5%)
	Italia	39	0
>100 g	Grecia	57	10 (17,5%)
	Italia	47	1 (2,1%)
Totale	Grecia	144	68 (47,2%)
	Italia	318	1 (0,3%)

Positività per *C. irritans* nelle orate esaminate in base alla classe di taglia e al paese di provenienza



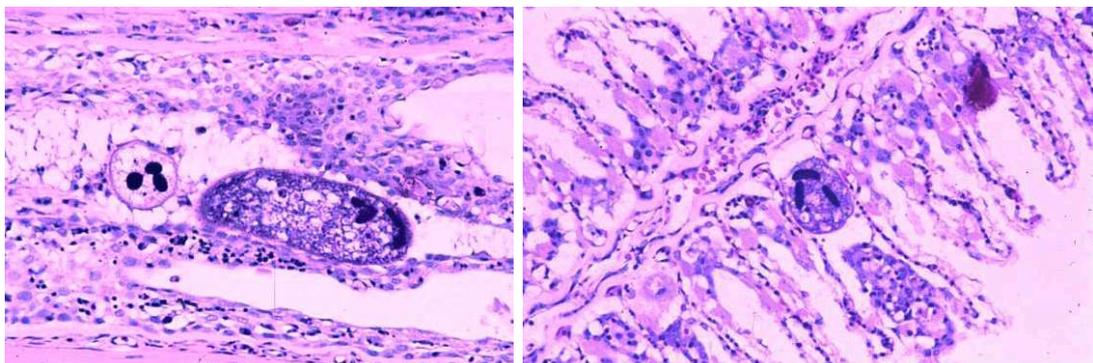
Positività per *C. irritans* delle orate esaminate in base alla classe di taglia

EFFETTI PATOGENI SULL'OSPITE

Le osservazioni istologiche condotte su branchie di orata parassitate da *C. irritans* hanno evidenziato come la presenza di un numero elevato di parassiti possa provocare intense reazioni iperplastiche ed iperproduzione di muco, con conseguente ipofunzionalità respiratoria, aspetto in linea con quanto descritto in precedenza in letteratura (Colorni & Burgess, 1997; Yanong, 2009).

Si sono osservate inoltre frequenti infezioni secondarie del tessuto colpito da parte di miceti e batteri opportunisti.

La conduzione di alcuni esami istologici condotti in collaborazione con il prof. Colorni del *Department of Pathobiology* del National Center for Mariculture dell'Israel Oceanographic and Limnological Research di Eilat, ha permesso di evidenziare come anche la penetrazione del teronte possa causare lesioni epiteliali tali da rappresentare porta d'ingresso per microrganismi opportunisti.



C. irritans nel derma e tra le lamelle branchiali di orata (EE, 40×)

TRICHODINA SPP.

Nel corso dell'indagine si sono verificati alcuni casi di infezione di orate allevate in Grecia da parte di *Trichodina* spp., con un unico soggetto positivo invece registrato in Italia.

Per la descrizione del parassita si rimanda a quanto già indicato nella spigola.

I valori di positività si sono osservati unicamente in gabbie sotto costa situate in Grecia, probabilmente per lo scarso ricambio idrico che caratterizza i siti risultati positivi, fattore che assieme all'elevata densità di allevamento facilita il permanere di materiale organico in grado di far proliferare ciliati commensali come *Trichodina* spp.

Sono stati registrati episodi di infestazione sia ad elevata che bassa intensità, nel primo caso in concomitanza alla presenza di monogenei branchiali quali *Sparicotyle chrysophrii* e *Furnestinia echeneis*, sicuramente di maggiore impatto sulla salute dell'ospite, mentre nel secondo caso la presenza di *Trichodina* spp. non aveva portato a manifestazioni patologiche, dato il carattere commensale/opportunista di questo parassita.



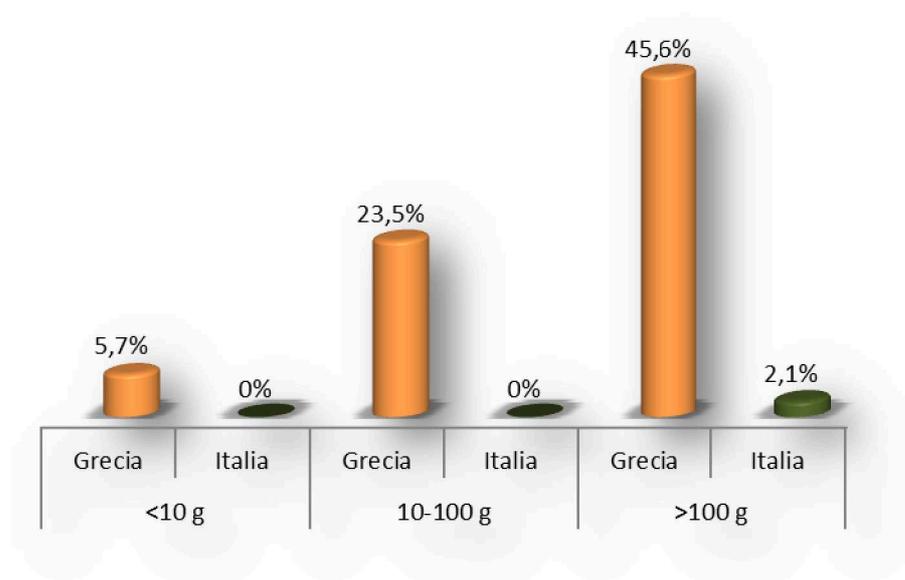
<i>Trichodina</i> spp.	Paese	Esaminati	Positivi (%)
Terra	Grecia	78	0
	Italia	229	0
GSC	Grecia	66	37 (56,1%)
	Italia	66	1 (1,5%)
GFC	Grecia	0	0
	Italia	23	0
GSO	Grecia	0	0
	Italia	0	0
Estensivo	Grecia	0	0
	Italia	0	0
Totale	Grecia	144	37 (25,7%)
	Italia	318	1 (0,3%)

Positività per *Trichodina* spp. delle orate esaminate in base al sistema di allevamento e al paese di provenienza

Contrariamente a quanto ci si aspetterebbe i sistemi a terra, che di solito presentano caratteristiche strutturali predisponenti la proliferazione di protozoi parassiti, sono risultati negativi. Si può ipotizzare che in questo caso gli impianti esaminati presentassero buone condizioni ambientali e che le buone pratiche igienico-sanitarie fossero eseguite correttamente.

<i>Trichodina</i> spp.	Paese	Esaminati	Positivi (%)
<10 g	Grecia	53	3 (5,7%)
	Italia	232	0
10-100 g	Grecia	34	8 (23,5%)
	Italia	39	0
>100 g	Grecia	57	26 (45,6%)
	Italia	47	1 (2,1%)
Totale	Grecia	144	37 (25,7%)
	Italia	318	1 (0,3%)

Positività per *Trichodina* spp. nelle orate esaminate in base alla classe di taglia e al paese di provenienza



Positività per *Trichodina* spp delle orate esaminate in base alla classe di taglia

Per quanto riguarda le classi di peso delle orate esaminate, quelle di taglia maggiore sono risultate maggiormente suscettibili, risultato che in generale

contrasta con quanto riportato in letteratura (Yemmen *et al.*, 2011), dove i pesci di taglia minore sono generalmente più sensibili all'azione di parassiti a trasmissione diretta. La differenza osservata nella presente ricerca può essere spiegata in termini di biomassa in gabbia, in quanto le orate di taglia maggiore risultate positive per *Trichodina* spp. erano nettamente più concentrate rispetto a quelle più piccole, facilitando così la trasmissione diretta del ciliato.

FURNESTINIA (LAMELLODISCUS) ECHENEIS

Conosciuto in passato anche come *Dactylogyrus echeneis* e *Diplectanum echeneis*, recentemente è stato oggetto di dibattito tassonomico in quanto il genere *Furnestinia* è stato messo in sinonimia con il genere *Lamellodiscus* (Desdevises, 2001; Justine & Briand, 2010), sebbene altri autori lo considerino



ancora un genere a sé stante per le significative differenze morfometriche che presentano *Lamellodiscus* e *Furnestinia* (Antonelli *et al.*, 2010) a livello di squamodisco.

Questo monogeneo riconosce l'orata quale ospite idoneo, dove va a localizzarsi a livello branchiale. Presenta un corpo di dimensioni ridotte (0,75-1mm), pressoché cilindrico e leggermente assottigliato all'estremità anteriore. L'organo adesivo è costituito da un unico grande squamodisco costituito da 10 file concentriche di lamelle e provvisto posteriormente di due paia di grandi uncini (ventrali e dorsali), di due barre trasversali, una barra medio-ventrale sottile e di 14 piccoli uncini marginali (Bychowsky, 1957; Domingues e Boeger, 2008).

Alcuni autori suggeriscono che la morfologia dell'organo adesivo può essere direttamente correlata al microhabitat del parassita (Chisholm & Whittington, 1998). L'ipertrofia del lamellodisco può essere considerato come un adattamento morfologico probabilmente a causa della piccola dimensione di *F.*

echeneis, evidenziando l'importante ruolo di questa struttura nell'attacco sicuro del parassita al suo ospite. L'aspirazione fornita da un organo adesivo con una vasta area di contatto è il modo più importante per permettere al parassita di attaccarsi vigorosamente al suo ospite, Il corpo del parassita è dotato di numerosi recettori, la maggior parte con significato funzionale. Esistono diversi tipi di strutture sensoriali individuati per *F. echeneis* e osservati già in precedenza nei monogenei, aventi forma e distribuzione variabile a seconda della specie (Buchmann & Lindenstrøm, 2002).

Dalle ghiandole cefaliche *F. echeneis* produce una sostanza mucosa adesiva che aiuta il parassita ad attaccarsi e spostarsi sulla superficie corporea dell'ospite. I microvilli presenti sulla superficie del corpo di *F. echeneis* sembrano strutture del tegumento comuni a molti monopisthocotylea (Whittington *et al.*, 2000).

F. echeneis è un parassita oviparo la cui presenza è stata registrata solo su *S. aurata* (Paperna *et al.*, 1977; Antonelli *et al.*, 2010).

Le fluttuazioni dei tassi di infestazione hanno dimostrato che la temperatura dell'acqua determina un preciso ciclo stagionale del parassita, esercitando una notevole influenza sulla dinamica delle popolazioni di *F. echeneis*. Cambiamenti stagionali in prevalenza e abbondanza suggeriscono che *F. echeneis* abbia un ciclo annuale di vita, con un periodo di infestazioni di maggiore intensità in autunno. La popolazione di *F. echeneis* infatti sembra aumentare mentre la temperatura dell'acqua diminuisce (Oliver, 1982). Molti studi condotti sul comportamento di monogenei Diplectanidae su pesci in condizioni di allevamento hanno dimostrato che la temperatura dell'acqua è il principale fattore che influenza la crescita e la riproduzione della popolazione (Silan e Maillard, 1986; Cecchini, 1994; Cecchini *et al.*, 1998). Le variazioni dei tassi di infestazione di *F. echeneis* attraverso le stagioni, possono anche essere spiegate dai cambiamenti nel comportamento dei pesci associati alla fluttuazione della temperatura. Durante i periodi di diminuzione della temperatura dell'acqua abbiamo anche una indebolimento del sistema immunitario del pesce con conseguente maggiore vulnerabilità ai parassiti

(Oliver, 1982). Le condizioni di allevamento sono un ulteriore fattore di influenza sulla dinamica di popolazione di *F. echeneis* in quanto le orate selvatiche non sono mai accompagnate da intensità elevate di infestazione, probabilmente a causa della dispersione delle uova nell'ambiente marino, mentre in condizioni di allevamento ad alta densità e con una limitata distanza dal fondo marino il trasferimento dei parassiti da individuo a individuo è estremamente facilitato, così come la trasmissione dall'ambiente selvatico al pesce allevato in gabbia, anche grazie al ciclo biologico diretto dei monogenei, senza ospite intermedio (Buchmann e Lindenstrøm, 2002; Fioravanti *et al.*, 2006; Hayward *et al.*, 2007).

Furnestinia echeneis è diffusa in tutto il bacino del mediterraneo, dove rappresenta un importante parassita dell'orata (Orecchia e Paggi, 1978, Radujkovic e Euzet, 1989).

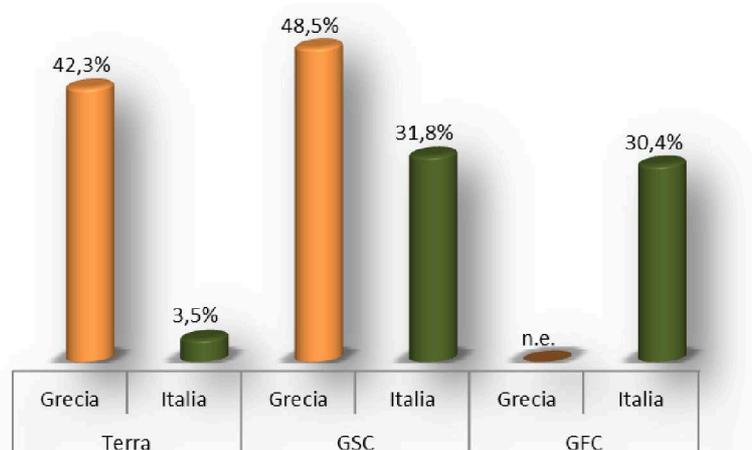
Non viene considerato un monogeneo particolarmente patogeno (Reversat *et al.*, 1992), anche se ad alte intensità d'infestazione si suppone possa determinare lesioni branchiali (Alvarez-Pellitero, 2004; Vagianou *et al.*, 2006) ed in passato siano stati riportati episodi di mortalità anche gravi riferiti ad infestazioni massive di questo parassita (Paperna *et al.*, 1977) Questo monogeneo nell'ospite va a localizzarsi a livello branchiale. L'attacco degli uncini all'epitelio branchiale provoca una reazione iperplastica ed iperproduzione di muco, con conseguente perdita di funzionalità dell'epitelio respiratorio. I danni sono più gravi negli avannotti, dove si può avere fusione delle lamelle secondarie. I disturbi respiratori insorgono in conseguenza alla malattia branchiale con successivo dimagrimento dovuto all'appetito capriccioso e peggioramento degli indici di crescita.

ANALISI DESCRITTIVA DEI RISULTATI

F. echeneis è stato individuato in 101 (21,9%) dei 462 soggetti di orata esaminati, sempre in sistemi intensivi a terra e in GSC in Grecia e in Italia e GFC in Italia. Le percentuali di positività sono illustrate nella tabella e nel grafico seguenti.

<i>Furnestinia echeneis</i>	Paese	Esaminati	Positivi (%)
Terra	Grecia	78	33 (42,3%)
	Italia	229	8 (3,5%)
GSC	Grecia	66	32 (48,5%)
	Italia	66	21 (31,8%)
GFC	Grecia	0	0
	Italia	23	7 (30,4%)
GSO	Grecia	0	0
	Italia	0	0
Estensivo	Grecia	0	0
	Italia	0	0
Totale	Grecia	144	65 (45,1%)
	Italia	318	36 (11,3%)

Positività per *Furnestinia echeneis* delle orate esaminate in base al sistema di allevamento e al paese di provenienza



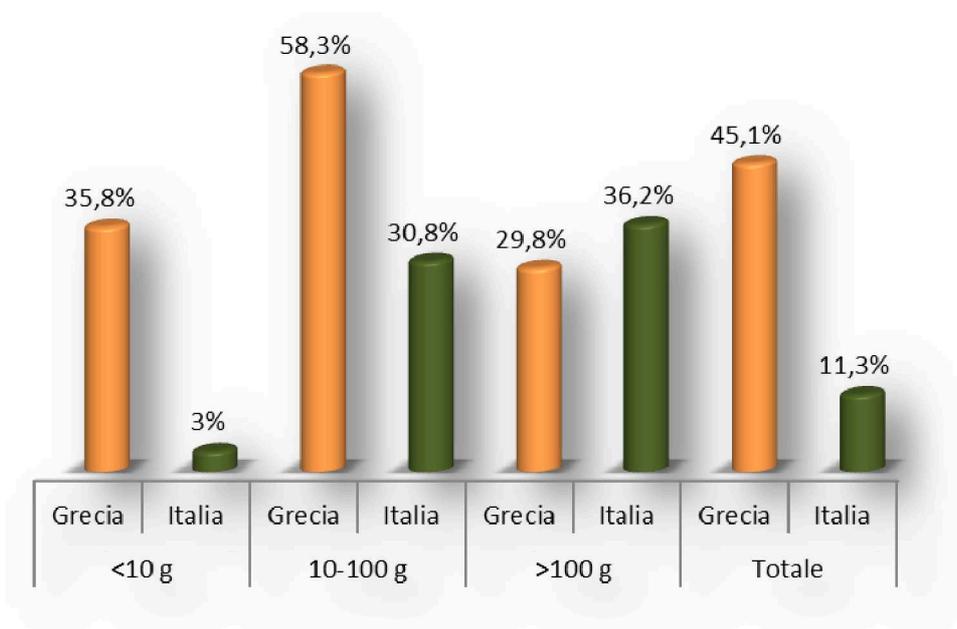
Percentuali di positività per *Furnestinia echeneis* in orata in base al sistema di allevamento

Alla luce dei valori di positività riscontrati nei due paesi si può evidenziare come *F. echeneis* non presenta maggiore diffusione in un sistema d'allevamento rispetto all'altro, purché la distanza dal fondo sia sufficientemente ridotta da permettere la migrazione della larva dopo la schiusa delle uova sul fondo.

In relazione alla categoria di taglia, *F. echeneis* è stata riscontrata in tutte le categorie come schematizzato nella tabella e nel grafico seguenti. Spiccano le differenze tra Grecia ed Italia per le categorie <10g e 10-100g, con valori di positività sensibilmente più elevati nel paese ellenico, probabilmente per caratteristiche ambientali intrinseche agli impianti sottoposti a campionamento.

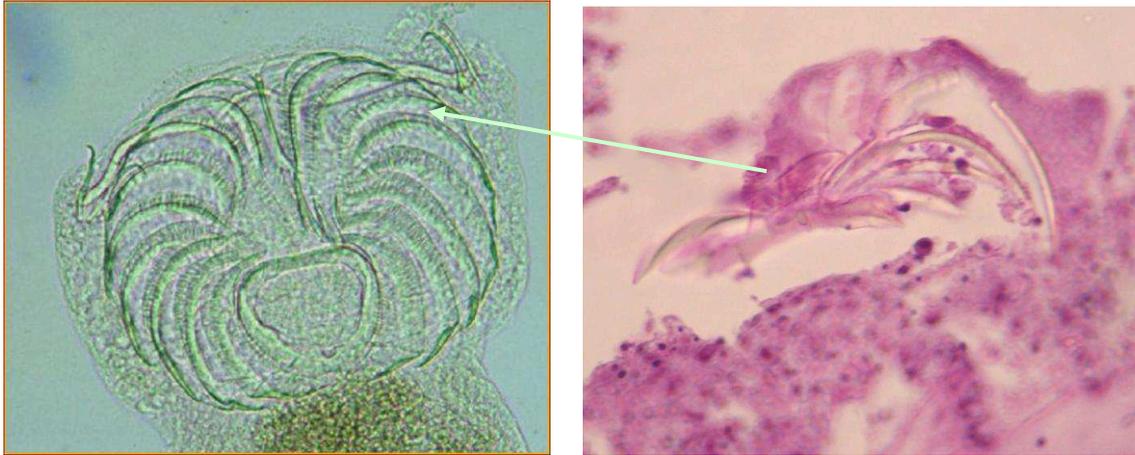
<i>Furnestinia echeneis</i>	Paese	Esaminati	Positivi (%)
<10 g	Grecia	53	19 (35,8%)
	Italia	232	7 (3%)
10-100 g	Grecia	34	29 (85,3%)
	Italia	39	12 (30,8%)
>100 g	Grecia	57	17 (29,8%)
	Italia	47	17 (36,2%)
Totale	Grecia	144	65 (45,1%)
	Italia	318	36 (11,3%)

Positività per *Furnestinia echeneis* nelle orate esaminate in base alla classe di taglia e al paese di provenienza



Positività per *Furnestinia echeneis* delle orate esaminate in base alla classe di taglia

Il valore d'intensità d'infestazione medio rilevato è stato di 6,3 parassiti/arco branchiale, con valori compresi tra 1 e 50. Anche ad intensità elevate non è stato possibile evidenziare stati di sofferenza branchiale correlabili alla parassitosi.



Branchie di orata: particolare dell'apparato di adesione di *F. echeneis* (a sinistra: a fresco; a destra: EE, 40×).

EFFETTI PATOGENI SULL'OSPITE

L'esame istologico dei preparati branchiali non ha permesso di evidenziare lesioni riferibili al parassita anche nei soggetti che presentavano un'intensità d'infestazione pari o superiore a 50 parassiti/arco branchiale, in linea con quanto notato da Antonelli *et al.* nel 2010 ed in contrasto con alcune segnalazioni fatte in passato che riportavano episodi di mortalità anche gravi causati da questo monogeneo (Paperna, 1977).

La colorazione di ematossilina-eosina si è rivelata utile a ben evidenziare la struttura dell'opisthaptor e soprattutto gli organi riproduttivi maschili (vedi figura a lato).



SPARICOTYLE CHRYSOPHRII

Sparicotyle chrysophrii è un diffuso ed importante ectoparassita dell'orata.

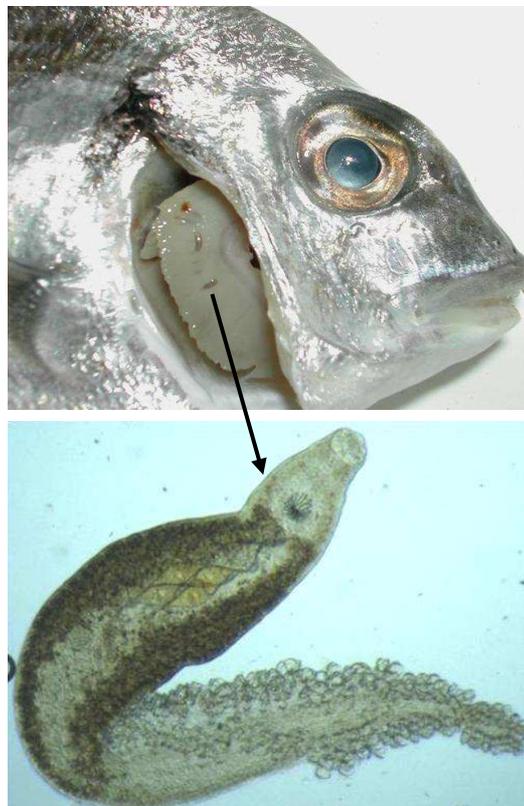
Appartiene al gruppo tassonomico dei Polyopisthocotylea.

Il prohaptor mostra due ventose che si aprono nelle cavità buccale, l'atrio genitale è armato e presenta due file di spine concentriche e quattro spine centrali. Le uova sono romboidali di colore giallo brunastre, con prolungamenti filamentosi ad entrambi i poli (Caffara *et al.*, 1998).

Il ciclo biologico è diretto: una volta emesse da parte dell'adulto, le uova si schiudono e lasciano fuoriuscire un oncomiracidio che si attaccherà ad un nuovo ospite o, nel caso fossero rimaste ancorate alle branchie, allo stesso ospite.

Sparicotyle chrysophrii è diffuso in tutto il bacino del Mediterraneo, e dell'Atlantico orientale fino alle coste del Marocco e nel mar Nero dove rappresenta un importante parassita dell'orata (Orecchia & Paggi, 1978, Radujkovic & Euzet, 1989) in coincidenza con la distribuzione del suo ospite.

Tra i fattori che determinano l'infezione da *S. chrysophrii* la temperatura (Gonzalez-Lanza *et al.* 1991; Oliver 1982; Robertsen *et al.* 2008; Winger *et al.* 2008) rappresenta il più importante con maggiore incidenza tutto il periodo dell'anno con maggior prevalenza durante l'inverno. Ad esempio Antonelli *et al.* hanno pubblicato nel 2010 una ricerca fatta in Corsica valutando la temperatura in tre allevamenti nel periodo di tempo gennaio 2008 – maggio 2009. Nel corso dello studio si è evidenziato che la temperatura attorno ai 13°C registrata in inverno coincideva con i maggiori valori di abbondanza media del parassita,



senza però esitare in mortalità, a differenza di altre indagini effettuate precedentemente (Faisal & Iman; 1990; Sanz, 1992; Alvarez-Pellitero, 2004; Planas, 2006), in cui episodi di mortalità più gravi si manifestavano durante la primavera e l'estate.

Sembra probabile secondo gli autori che i cambiamenti della temperatura nel passaggio dall'estate all'inverno producano un maggiore stress nelle orate, un abbassamento dell'immunità e un cambiamento ormonale provocando un calo produttivo negli animali, letargia (Sitjà-Bobadilla *et al.*, 2006) maggiore suscettibilità alle infezioni e infestazioni parassitarie e, nei casi di infestazioni massive, anche gravi episodi di mortalità (Paperna *et al.*, 1977).

L'azione patogena del parassita si esplica attraverso l'attacco all'epitelio branchiale tramite le clamps, in grado di determinare solitamente lesioni non gravi, ma che in presenza di un elevato numero di parassiti dotati inoltre di spiccata ematofagia, svolgono un'azione anemizzante proporzionale all'intensità d'infestazione. Gravi anemie possono essere osservate anche ad intensità d'infestazione relativamente basse (10-20 parassiti/arco branchiale) (Sanz, 1992). In presenza di alta intensità d'infestazione parassitaria si può avere iperplasia epiteliale con fusione delle lamelle e necrosi con sfaldamento cellulare e lisi cartilaginea in conseguenza di infestazioni secondarie da altri batteri e parassiti, anemia generalizzata e morte (Padros & Crespo 1995, Cruz & Silva *et al.*, 1997, Caffara *et al.*, 2005).

Per la diagnosi sono sufficienti l'osservazione allo stereomicroscopio mediante osservazione a fresco raschiando il primo arco branchiale perché è quello maggiormente contaminato rispetto agli altri archi (Oliver, 1984), mentre l'identificazione di specie viene effettuata mediante osservazione morfometrica delle *clamps* e delle spine dell'apertura genitale. Morfologicamente le caratteristiche di maggior rilievo per l'identificazione tassonomica sono le numerose *clamps*, le due ventose localizzate nel prohaptor, l'atrio genitale armato con due file di spine concentriche e quattro spine centrali e le uova romboidali giallo brunastre con prolungamenti filamentosi ad entrambi i poli che

permettono l'ancoraggio delle stesse a substrati sommersi come ad esempio le maglie delle reti nelle gabbie.

La terapia con formalina, non autorizzata in Europa, è in genere considerata efficace, anche se va ripetuta dopo 2-3 settimane in quanto le uova sono resistenti al trattamento. Altri trattamenti sperimentali si sono effettuati sia *in vitro* che *in vivo* con praziquantel, etanolo e perossido di idrogeno (Sitjà-Bobadilla *et al.*, 2006).

ANALISI DESCRITTIVA DEI RISULTATI

Questo monogeneo Microcotylidae è stato reperito in 25 (5,4%) delle 462 orate esaminate, solo in soggetti allevati in GSC sia in Grecia che in Italia, come schematizzato nella tabella e nel grafico seguenti.

<i>Sparicotyle chrysophrii</i>	Paese	Esaminati	Positivi (%)
Terra	Grecia	78	0
	Italia	229	0
GSC	Grecia	66	15 (22,7%)
	Italia	66	10 (15,2%)
GFC	Grecia	0	0
	Italia	23	0
GSO	Grecia	0	0
	Italia	0	0
Estensivo	Grecia	0	0
	Italia	0	0
Totale	Grecia	144	15 (10,4%)
	Italia	318	10 (3,1%)

Positività per *Sparicotyle chrysophrii* delle orate esaminate in base al sistema di allevamento e al paese di provenienza

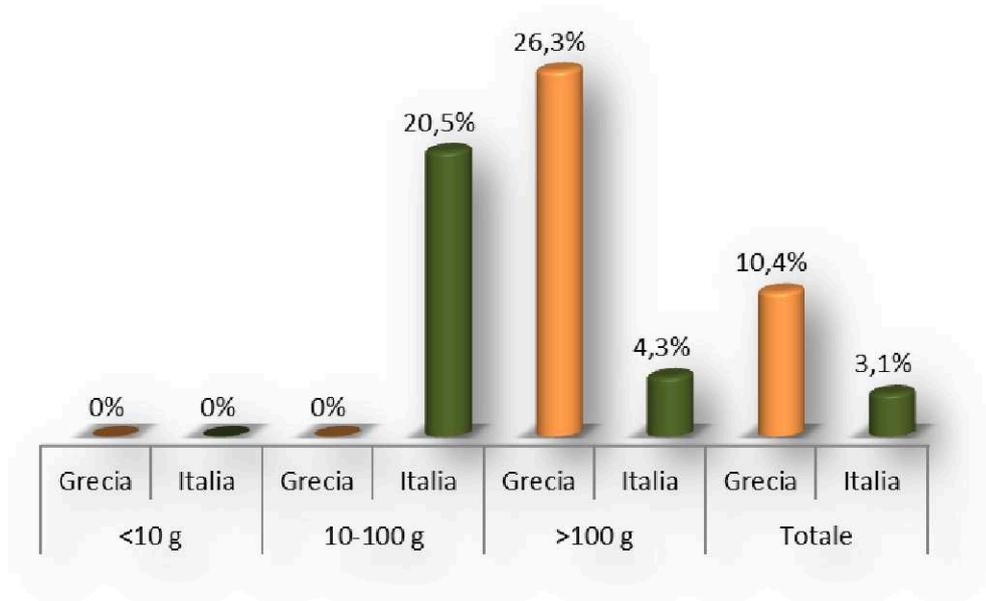
Tali valori risultano sensibilmente inferiori rispetto a precedenti studi (Faisal & Imam, 1990; Athanassopoulou *et al.*, 2005; Antonelli *et al.*, 2010; Sitjà-Bobadilla *et al.*, 2010) e maggiori rispetto ad altri (Mladineo, 2005; Fioravanti *et al.*, 2006;).

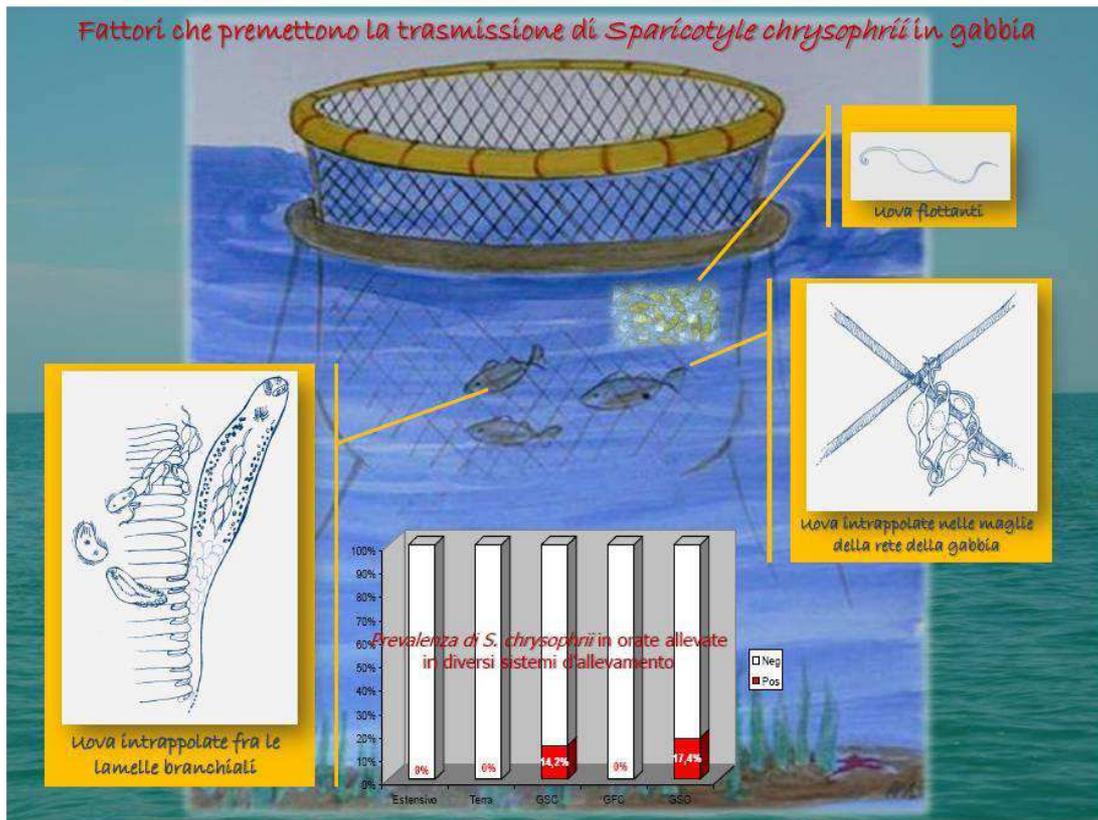
In relazione alle categorie di taglia, *S. chrysophrii* ha mostrato valori di positività più elevati nei soggetti di peso compreso tra 10 e 100 g, come illustrato nella tabella qui di seguito.

<i>Sparicotyle chrysophrii</i>	Paese	Esaminati	Positivi (%)
<10 g	Grecia	53	0
	Italia	232	0
10-100 g	Grecia	34	0
	Italia	39	8 (20,5%)
>100 g	Grecia	57	15 (26,3%)
	Italia	47	2 (4,3%)
Totale	Grecia	144	15 (10,4%)
	Italia	318	10 (3,1%)

Positività per *Sparicotyle chrysophrii* nelle orate esaminate in base alla classe di taglia e al paese di provenienza

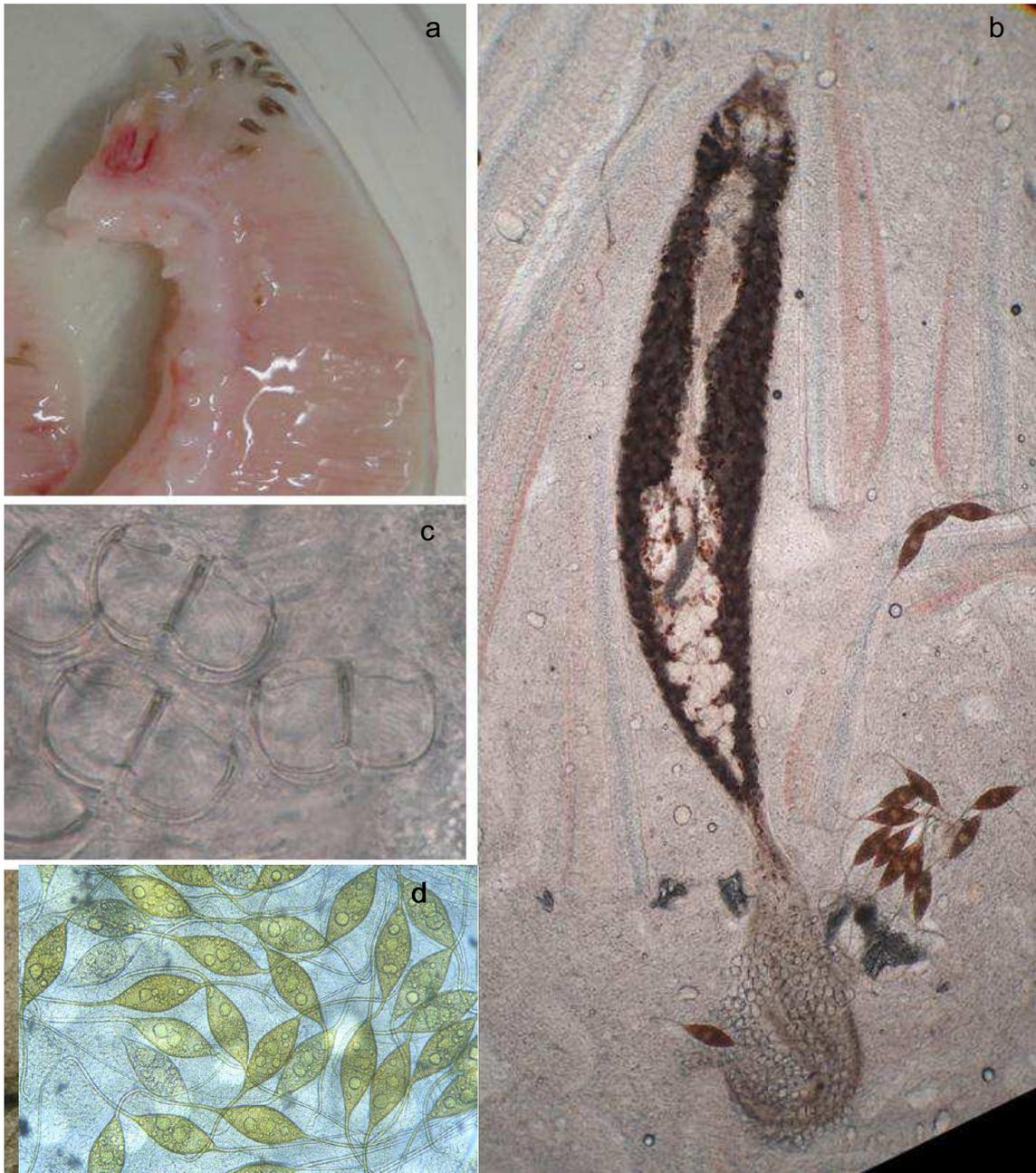
Il reperimento di *S. chrysophrii* unicamente in gabbie sotto costa riflette il ciclo biologico di questo monogeneo polyopisthocotyleo che produce uova dotate di appendici viscosi in grado tipicamente di attaccarsi alla maglia delle reti che compongono le gabbie, permettendo di ridurre la distanza tra gli stadi larvali infettanti (oncomiracidio) che schiudono dalle uova e l'ospite pesce (Sitjà-Bobadilla & Alvarez-Pellitero, 2009)





Ciclo biologico di *S. chrysophrii* e fattori che ne influenzano la diffusione in gabbia

All'esame anatomopatologico i soggetti parassitati da un numero di parassiti superiore a 8/arco branchiale presentavano frequentemente branchie pallide e, all'apertura della cavità addominale, un grado più o meno accentuato di anemia sistemica.



Infestazione da *Sparicotyle chrysophrii* in orata allevata in gabbia: (a) branchie fortemente anemiche con presenza di parassiti raccolti ad un'estremità; (b) esemplare di *S. chrysophrii* in toto; (c) 3 clamps dell'opisthaptor; (d) uova con tipica forma romboidale e i filamenti posizionati ai poli.

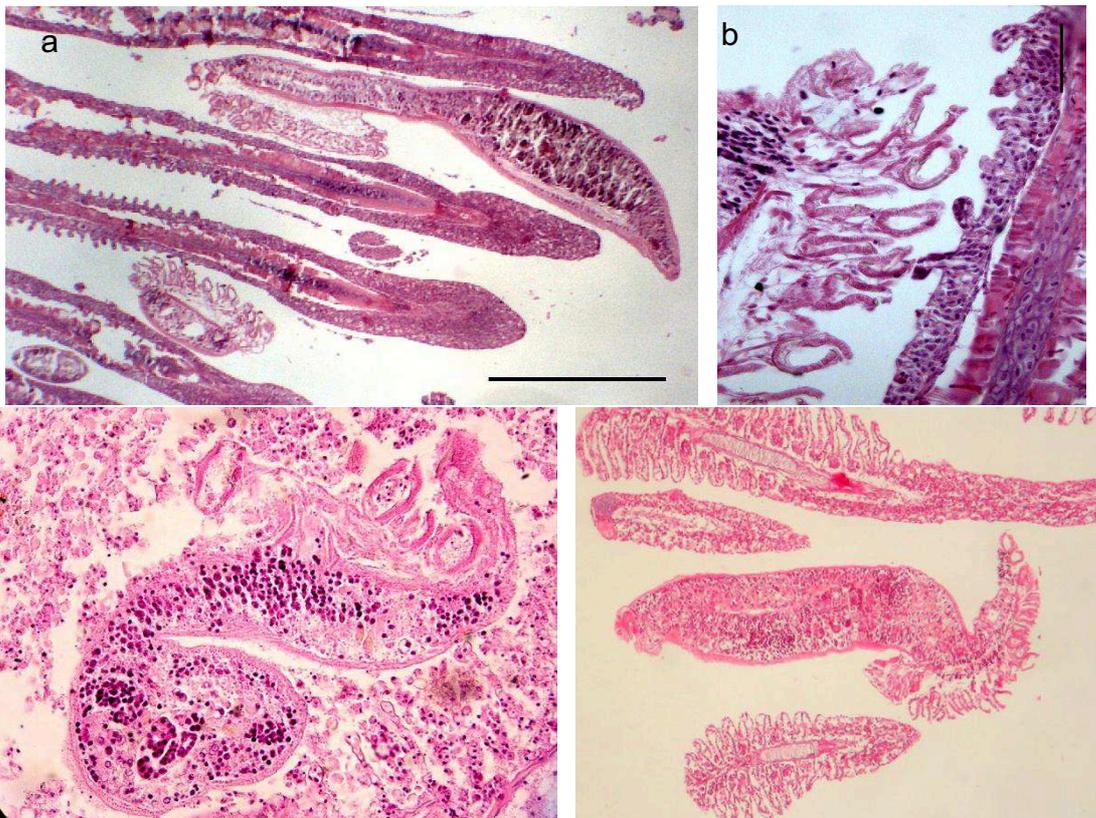
L'intensità d'infestazione media rilevata nei 25 soggetti positivi è risultata essere 7,6 parassiti per arco branchiale, con valori compresi tra 5 e 12, quantità

già sufficiente a esplicare una certa patogenicità. Anche nei soggetti di peso >100g la presenza di 8-10 parassiti/arco branchiale veniva spesso associata a pallore delle branchie e talvolta ad anemia generalizzata.

EFFETTI PATOGENI SULL'OSPITE

All'esame istopatologico le branchie parassitate con intensità d'infestazione superiore a 8 parassiti/arco branchiale, mostravano vari gradi di iperplasia epiteliale con fusione delle lamelle e necrosi a tratti molto estesa con sfaldamento cellulare e lisi cartilaginea in conseguenza di infezioni secondarie da mixobatteri.

In alcuni esemplari del parassita si osservava a livello di apparato digerente la presenza di numerosi eritrociti, mentre i filamenti branchiali manifestavano grave anemia, evidente per la presenza di vasi branchiali completamente svuotati dalle cellule ematiche.



Branchie di orata: presenza di parassita metazoo ascrivibile a *S. chrysophrii*. Si osserva iperplasia e necrosi con sfaldamento epiteliale. I vasi branchiali si presentano anemici mentre eritrociti sono presenti nell'apparato digerente del trematode (a, b, EE, 4×, 10×) (c, d, EE, 4×).

I risultati delle indagini istopatologiche sono sovrapponibili a quanto osservato recentemente in letteratura (Sitjà-Bobadilla & Alvarez-Pellitero, 2009).

Ogni *clamp* del parassita si attacca ad una lamella branchiale dell'ospite, con un numero di clamps attaccate proporzionale alla grandezza del parassita e che può arrivare ad oltre 40 clamps contemporaneamente attaccate. La tenacia con cui le *clamps* agganciano le lamelle porta alla formazione di sinechie al sito di attacco, con lesioni che possono portare alla rottura dell'epitelio e dei vasi ematici periferici. La reazione tissutale dell'ospite è generalmente blanda senza infiltrati di cellule infiammatorie.

CARDICOLA SP.

Alla famiglia Aporocotylidae appartengono trematodi digenei di forma lanceolata, lunghi 1,5-2 mm e privi di ventose che allo stadio adulto si localizzano a livello del sistema circolatorio e del rene.

Le uova, di forma pressoché triangolare, vengono eliminate in circolo e vanno a localizzarsi in diversi organi interni (dove vengono incapsulati dalla reazione) o nelle branchie, dove schiude un miracidio che perfora l'epitelio e fuoriesce nell'acqua. In tal caso si possono avere gravi lesioni branchiali, con emorragie e necrosi. Eventuali infezioni secondarie possono aggravare le lesioni e provocare mortalità.

Il miracidio dovrà trovare l'ospite intermedio, rappresentato da invertebrati bentonici, per trasformarsi in sporocisti e quindi in cercarie; queste ultime abbandoneranno il mollusco e penetreranno nell'ospite pesce dove diventeranno adulti.

Nel caso di *Cardicola forsteri*, parassita di *Thunnus maccoyi* descritto da Cribb *et al.* nel 2000 ed il cui ciclo biologico è stato recentemente ricostruito (Cribb *et al.*, 2011), l'ospite invertebrato è costituito da un gruppo di specie di policheti della famiglia Terebellidae e le cercarie non nuoterebbero attivamente

in cerca dell'ospite pesce ma si farebbero trasportare dalla corrente. Questo comportamento secondo gli autori potrebbe essere sfruttato nell'ambito della profilassi, evitando di esporre i tonni d'allevamento a correnti a rischio, soprattutto aumentando la distanza delle gabbie dal fondo. Analogamente Køie (1982) ricostruì il ciclo di *Aporocotyle simplex* individuando anche in questo caso come ospite intermedio un anellide polichete.

Padrós *et al.* hanno descritto nel 2001 in Spagna un'infezione da Aporocotylidae in orate, descrivendo lesioni branchiali con necrosi ed emorragie derivanti dall'occlusione dei vasi ad opera delle uova del parassita.

Il mancato isolamento del parassita nella sua interezza non ha consentito una descrizione della specie, mentre nel 2010 Holzer *et al.* hanno descritto questa nuova specie di Aporocotylidae denominandola *Cardicola aurata* sp. n., le cui uova si localizzano nelle branchie e gli adulti nel rene dell'orata. La descrizione di *C. aurata* e della sua biologia nell'ospite orata risulta sovrapponibile alle osservazioni effettuate durante questa ricerca, sebbene nel nostro caso non sia stato possibile isolare l'adulto che, peraltro, risulta particolarmente difficile da reperire per l'estrema facilità a deteriorarsi.

ANALISI DESCRITTIVA DEI RISULTATI

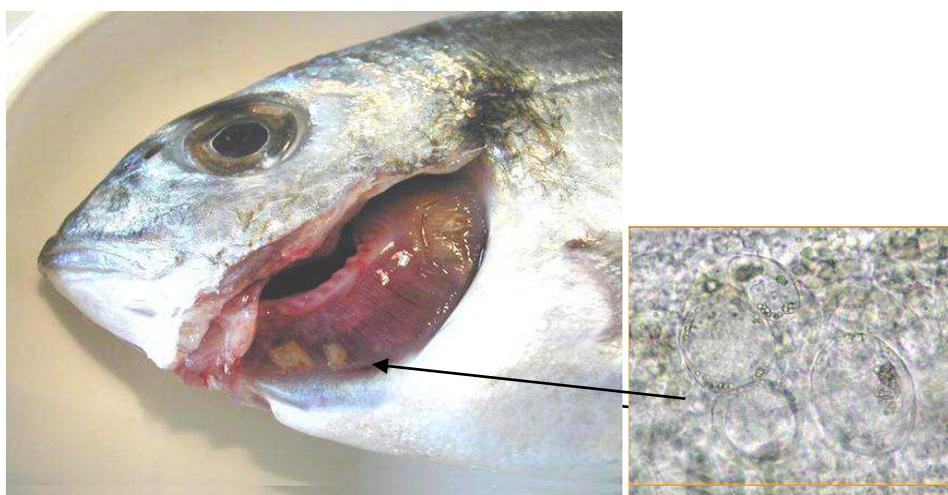
La presenza di uova di trematodi digenei Aporocotylidae è stata riscontrata in 24 (5,2%) delle 462 orate esaminate in soggetti allevati in Italia di peso compreso tra 10 e 100 g (7 soggetti con un percentuale di positività del 17,9%) e di peso superiore ai 100g (17 soggetti con un percentuale di positività del 36,2%). Tutte le orate positive provenivano da GSC situate in Italia.

<i>Aporocotylidae</i>	Paese	Esaminati	Positivi (%)
Terra	Grecia	78	0
	Italia	229	0
GSC	Grecia	66	0
	Italia	66	24 (36,4%)
GFC	Grecia	0	0
	Italia	23	0
GSO	Grecia	0	0
	Italia	0	0

Estensivo	Grecia	0	0
	Italia	0	0
Totale	Grecia	144	0
	Italia	318	24 (7,5%)

Positività di orata per uova di digenei Aporocotylidae distinte per sistema d'allevamento

I valori di prevalenza osservati nel corso della presente indagine risultano più bassi rispetto a quanto descritto da altri autori per esempio in Spagna (Holzer *et al.*, 2008) dove *Cardicola aurata* è stata individuata nel 82-100% delle orate allevate in gabbia.



In un lotto di orate in cui è stato reperito un numero molto elevato di uova all'interno dei vasi branchiali, l'esame anatomopatologico ha evidenziato gravi lesioni a carico dei filamenti branchiali. Le lesioni apparivano come ammassi giallastri più o meno estesi frammisti a tessuto branchiale integro. Tali ammassi rappresentavano aree in necrosi che incorporavano uova del parassita, ammassi di batteri filamentosi ed epitelio branchiale disgregato.

L'esame parassitologico degli organi interni non ha permesso di evidenziare la presenza del parassita adulto.

EFFETTI PATOGENI SULL'OSPITE

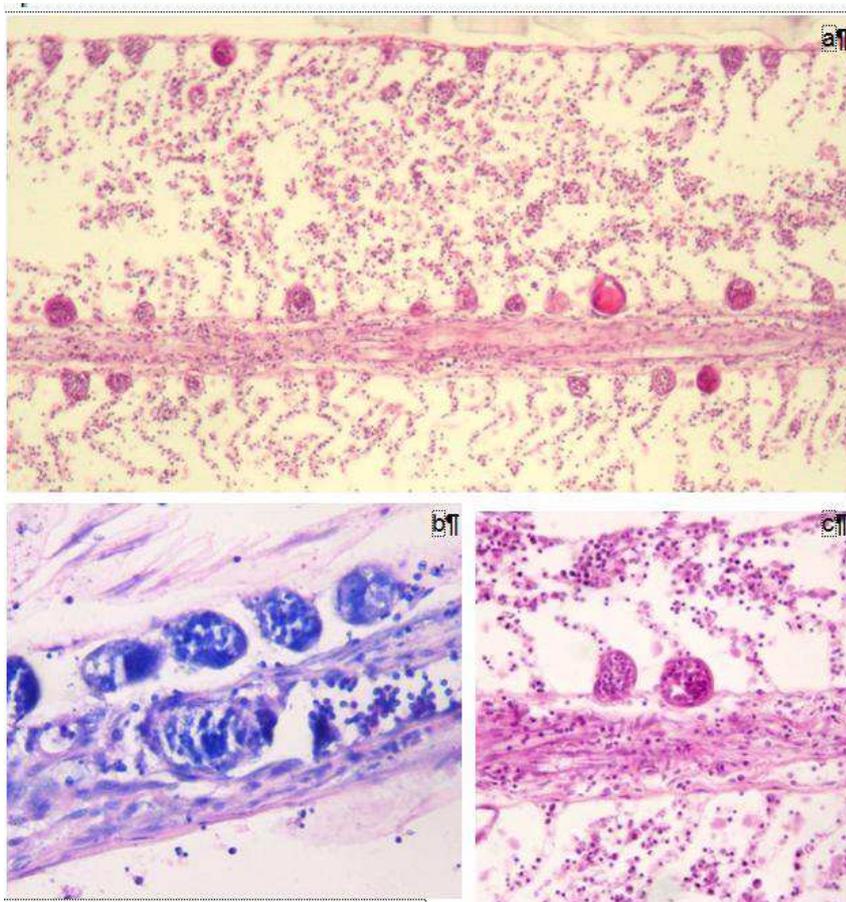
Le osservazioni istopatologiche da noi rilevate evidenziavano a livello branchiale la massiva presenza di uova e parallelamente grave sfaldamento

dell'epitelio branchiale con occlusione dei vasi delle lamelle branchiali secondarie, in particolare di quelli afferenti. Si osservavano inoltre fenomeni necrotici ed emorragie. Alcune uova erano presenti anche nell'asse del filamento alla base.

La parete delle uova si presentava eosinofila e all'interno si poteva rilevare la presenza del miracidio.

Lievi processi infiammatori erano visibili con la presenza di linfociti e granulociti, mentre in alcuni casi aggregati di cellule a granuli eosinofili erano visibili attorno alle uova.

Le lesioni riscontrate nei soggetti esaminati sembrano essere più gravi di quanto osservato da altri autori in infestazioni da Aporocotylidae in orata (Padros *et al.*, 2001) e piuttosto sovrapponibili a quelle descritte per *Paradeontacylix* spp. in *Seriola purpurascens*, dove però le infestazioni presentavano intensità più elevate.



Branchie di orata: uova di metazozi ascrivibili a trematodi digenei Aporocotylidae localizzate all'interno delle lamelle branchiali con ostruzione vasale e conseguente necrosi e sfaldamento cellulare (a, EE, 10x; b, Giemsa, 40x; c, EE, 40x).]

RISULTATI E DISCUSSIONE RELATIVI ALLA RICERCA DI LARVE DI *ANISAKIS* SPP. IN SPIGOLE ED ORATE

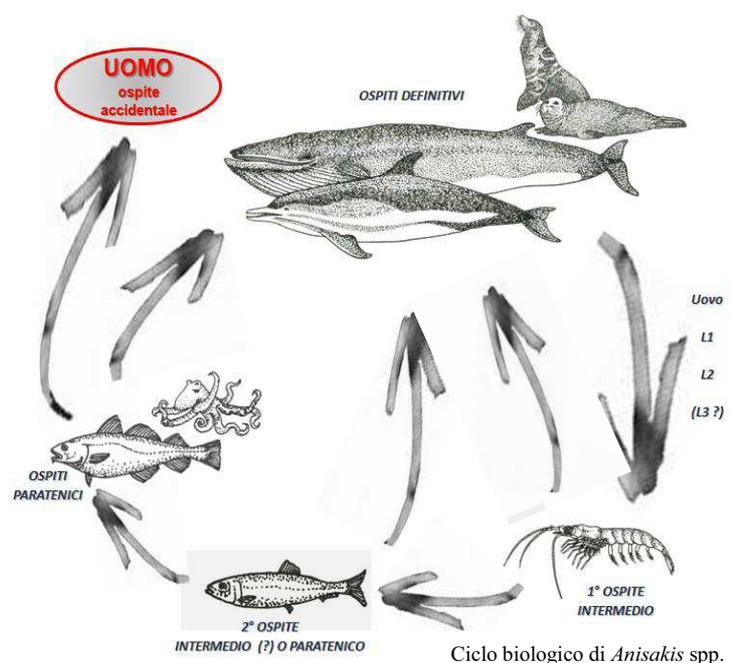
La presenza di larve di nematodi Anisakidae del genere *Anisakis* non è mai stata individuata nei soggetti di spigola ed orata allevati in gabbia esaminati durante la presente indagine.

L'esame visivo condotto macroscopicamente sugli organi viscerali e sulle porzioni muscolari, nonché l'esame condotto mediante transilluminazione di porzioni sottili del muscolo laterale, non ha mai evidenziato la presenza di stadi larvali di nematodi e/o di altri elminti che potessero essere riferibili a parassiti zoonotici.

L'importanza di questi risultati risiede nel fatto che le spigole e le orate allevate in gabbia potrebbero potenzialmente venire coinvolti nel ciclo biologico di parassiti Anisakidi.

I nematodi appartenenti al genere *Anisakis* presentano un ciclo vitale complesso, la cui realizzazione è legata a molteplici fattori biotici presenti negli ecosistemi marini e oceanici (vedi schema del ciclo biologico qui riportato).

Ospiti definitivi sono i mammiferi marini, rappresentati soprattutto dai cetacei e meno frequentemente dai pinnipedi, che albergano a livello gastrico gli adulti in grado di riprodursi ed eliminare con le feci nell'ambiente esterno le uova, da cui schiudono larve al terzo stadio (L3). Queste L3 raggiungono il



Ciclo biologico di *Anisakis* spp.

terzo stadio infettante quando ingerite da idonei ospiti intermedi rappresentati da piccoli crostacei (spt. Euphasiacea, ma anche copepodi, anfipodi, ecc.).

Se i crostacei parassitati da L3 vengono predati da pesci planctofagi, le larve penetrano attraverso la parete intestinale e vanno a localizzarsi in cavità addominale incistandosi soprattutto a livello delle sierose.

La catena biologica è poi ampliata da numerosi pesci e cefalopodi predatori (ospiti paratenici o “di trasporto”) in cui queste L3 possono accumularsi rimanendo vitali ed infettanti per lunghi periodi.

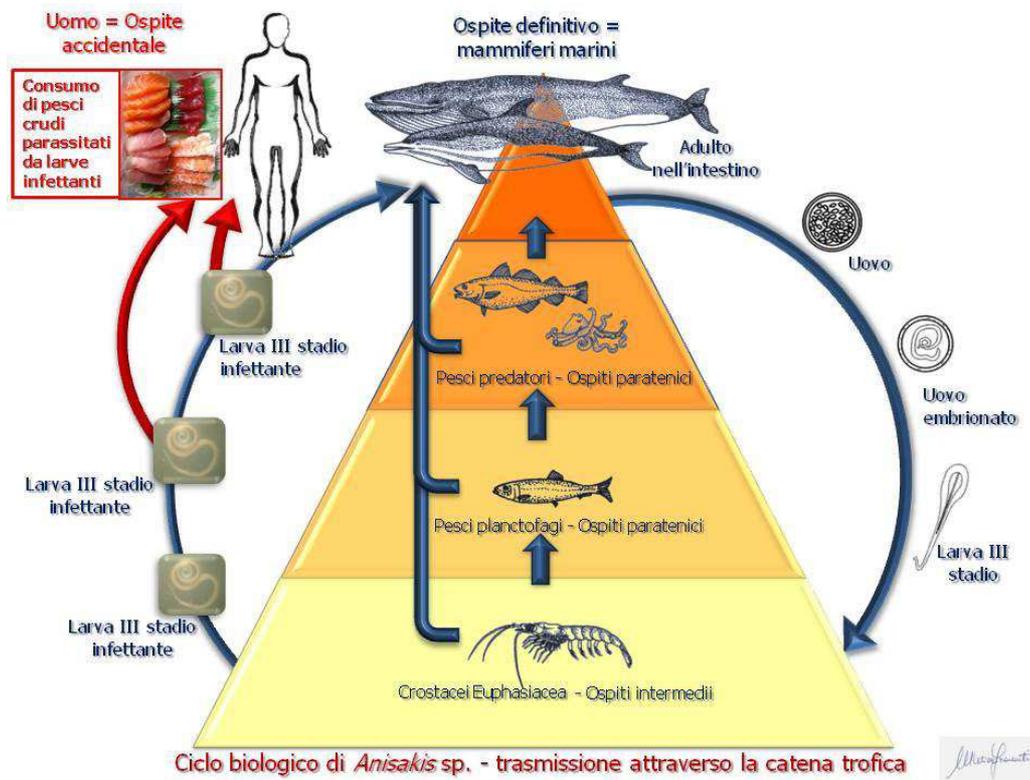
I mammiferi marini assumono la parassitosi ingerendo gli ospiti intermedi e/o paratenici che ospitano le L3 infettanti o, nel caso dei cetacei misticeti, alimentandosi dei crostacei parassitati.

L'uomo rappresenta solo un ospite accidentale e può infettarsi ingerendo le L3 mediante consumo di prodotti ittici crudi, poco cotti o sottoposti a preparazioni non idonee ad inattivare il parassita (es. affumicatura a freddo, marinatura, ecc.).

Elemento di rischio importante per la trasmissione all'uomo è rappresentato anche dalla frequente migrazione *post-mortem* delle larve dalla cavità addominale alla muscolatura del pesce.

Nell'uomo le L3 non riescono a sviluppare in adulti ma possono talvolta determinare lesioni di tipo invasivo o sindromi di natura allergica prima di andare incontro a devitalizzazione.

La realizzazione del ciclo vitale di *Anisakis* spp. è quindi necessariamente legata alla presenza di tutti quegli organismi acquatici marini che permettono lo sviluppo dei diversi stadi larvali e degli adulti, con vie di trasmissione che seguono strettamente le catene trofiche presenti all'interno degli ecosistemi marini ed oceanici.



Numerose specie ittiche d'interesse commerciale sono state descritte quali ospiti intermedi o paratenici di *Anisakis* spp., rappresentando quindi un potenziale rischio per il consumatore.

Le segnalazioni sono però riferite prevalentemente a soggetti selvatici provenienti da ambienti di pesca marini ed oceanici dove essi rientrano necessariamente nelle catene trofiche sopra descritte e possono quindi assumere le larve di *Anisakis* spp. attraverso l'ingestione di prede parassitate (crostacei e/o pesci e cefalopodi).

Le spigole e le orate allevate in gabbia potrebbero inserirsi nel ciclo biologico di *Anisakis* spp. quali ospiti paratenici, essendo in stretto contatto con popolazioni ittiche potenzialmente parassitate dagli stadi larvali di questo parassita. Va però evidenziato come, per quanto riguarda la maggior parte delle specie ittiche d'allevamento, l'alimentazione a base di mangime commerciale determini la mancata realizzazione di una catena trofica "naturale".

Possono fare eccezione quelle specie ittiche per cui ancora si ricorre alla somministrazione di pesce/scarti di pesce per l'alimentazione. A tal proposito può essere citato il recente lavoro di Shih *et al.* (2010), che hanno reperito *Anisakis simplex* in soggetti di cobia (*Rachycentron canadum*) allevati in gabbia a Taiwan quale conseguenza della pratica di somministrare pesce fresco (non congelato) nelle ultime fasi di allevamento.

Similarmente, anche il tonno rosso sottoposto a fasi di ingrasso in gabbia è stato trovato positivo per *Anisakis* spp. all'esame parassitologico (Mladineo *et al.*, 2008), e ciò potrebbe essere conseguenza, anche in questo caso, della somministrazione ai fini alimentari di pesce non congelato ma anche dell'origine selvatica dei soggetti sottoposti ad allevamento, che potrebbero quindi albergare le larve del parassita già al momento della loro immissione in gabbia.

Per quanto concerne invece le specie ittiche d'allevamento che vengono alimentate con mangime commerciale (es. salmoni, trote, spigole, orate, ecc.), le numerose indagini parassitologiche condotte negli ultimi decenni hanno evidenziato un quadro confortante che sembra indicare come sia altamente improbabile il rischio che possano venire parassitate da *Anisakis* spp.

Sebbene pubblicazioni scientifiche inerenti indagini rivolte specificatamente alla ricerca di larve di *Anisakis* spp. siano riferite prevalentemente a salmonidi allevati (salmone atlantico - Angot e Brasseur, 1993; Lunestad, 2003; salmone coho e trota iridea - Inoue *et al.*, 2000), esistono numerose fonti da cui si possono ricavare dati simili anche per altre specie ittiche:

- sul sito internet di Fish & Information Service (FIS) (<http://fis.com/fis/worldnews/worldnews.asp?monthyear=8-2008&day=18&id=29478&le&country=&special=&ndb=1&df=1>) vengono riportati nel 2008 i risultati di un'indagine condotta su branzini e orate allevati in Spagna da cui risulta che nessuno dei 309 soggetti esaminati presentava larve di *Anisakis* spp.;
- nel volume *Options méditerranéennes* Serie B: Etudes et Recherches N. 49 «Mediterranean aquaculture diagnostic laboratories» edito da CIHEAM/FAO nel 2004 a cura di Alvarez-Pellittero *et al.*, vengono riportati i dati forniti da numerosi laboratori diagnostici di ittiopatologia operanti

nell'area mediterranea e, fra i parassiti elencati e discussi, *Anisakis* spp. non risulta mai reperito nelle numerose specie ittiche prese in considerazione;

- in numerosi lavori scientifici inerenti la parassitofauna dei pesci d'allevamento non compare generalmente il riscontro di nematodi del genere *Anisakis* né in specie ittiche tradizionali (es. Ogawa e Yokoyama, 1998; Scholz, 1999; Mladineo, 2005; Fioravanti *et al.*, 2006) né in specie innovative (Rigos e Katharios, 2010) ad eccezione del tonno rosso (come già evidenziato in precedenza), seppur in genere non venga esplicitamente specificata la conduzione della ricerca di *Anisakis*. Va comunque evidenziato come in questi lavori venga riportata la presenza di endoparassiti aventi localizzazione analoga a quella delle larve di *Anisakis* spp., che sono peraltro facilmente individuabili all'esame visivo.

Si ritiene quindi che tutte le specie ittiche riprodotte in cattività ed allevate con sistemi di alimentazione basati sulla somministrazione di mangimi commerciali debbano essere assimilate ai salmoni per quanto concerne la valutazione del rischio (molto basso) di contrarre infestazioni da *Anisakis* spp., anche se dati epidemiologici specifici dovranno essere prodotti e pubblicati per avvalorare tale ipotesi (EFSA, 2010).

L'azzeramento del rischio appare comunque in linea generale difficile, soprattutto in allevamenti in gabbia, a causa delle possibili interazioni tra pesci allevati e popolazioni selvatiche di invertebrati e vertebrati.

A tal proposito, nel salmone atlantico è stato recentemente descritto un caso di infestazione da *Anisakis* sp. in un allevamento in gabbia in Canada (Marty, 2008), seppur con valori di prevalenza molto bassi (1/894 soggetti esaminati = 0,11%) ed un rischio relativo di infestazione calcolato nei salmoni allevati come 570 volte inferiore rispetto a quello riferibile ai salmoni selvatici.

Anche in una presentazione dell'EFSA su "*Food safety aspects of fish farming systems*", presentata da Berthe *et al.* (2009) al Workshop su "*Zoonotic infections from fish and shellfish*" tenutosi al congresso EAFP di Praga 2009 si dichiara, riguardo il "rischio parassiti" nei pesci d'allevamento, che i pesci

allevati hanno un accesso limitato agli ospiti intermedi (crostacei ed altri pesci) e che le segnalazioni di elminti (fra cui sono compresi anche i nematodi e quindi *Anisakis*) sono state “molto raramente” riportate. Inoltre, sebbene la prevalenza di *Anisakis simplex* nei pesci selvatici sia alta, lo stesso parassita non è stato mai reperito “in grande numero” in salmoni allevati.

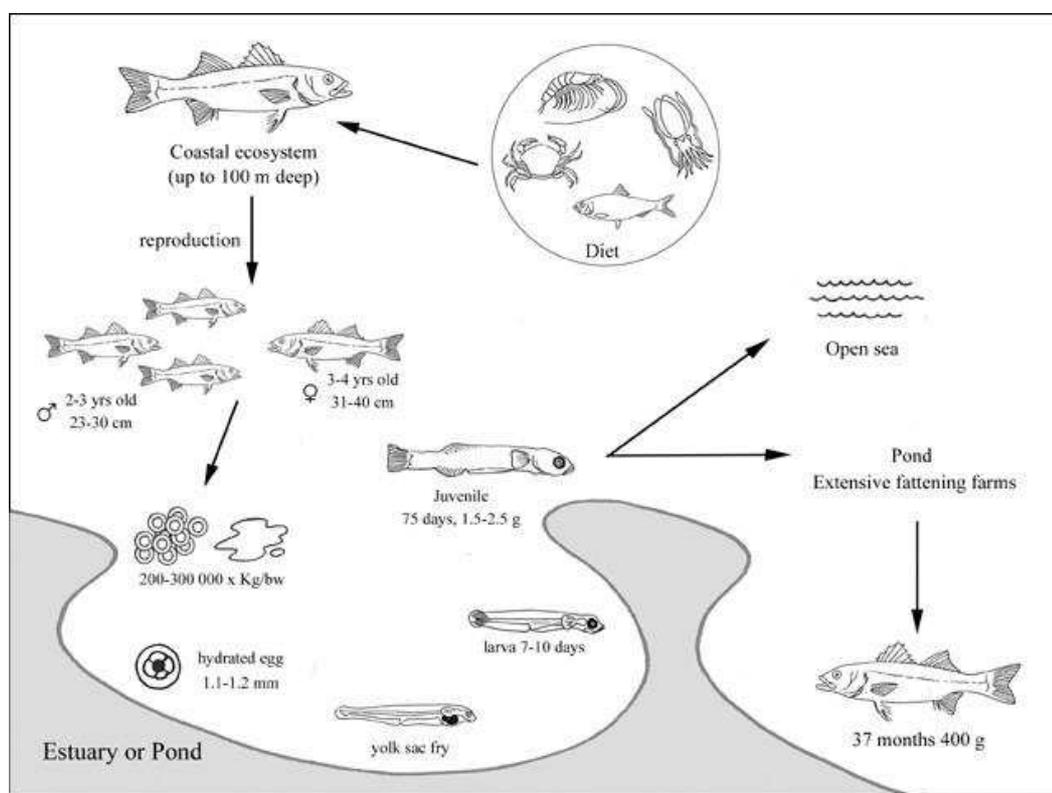
Infine, fra i risultati ottenuti nell’ambito del Progetto Europeo DIPNET “*Disease interactions and pathogen exchanges between farmed and wild aquatic population*” appare interessante annotare le conclusioni riportate nel capitolo relativo a *Anisakis* sp.: “...*The parasitic nematode Anisakis sp. is endemic in wild marine fish populations and in high numbers can cause liver damage to the host through localized tissue compression. Although Anisakis sp. infections can be acquired as a result of farmed stock ingesting infected copepods and/or small fish the species has a complicated indirect life cycle which is adapted to low host densities. The risk of infection to farmed stock can be further reduced by feeding pasteurized, artificial diets and a longer onshore growing period to exclude the risk of ingesting infected copepods. As such, in the intensive farming environment, problematical interactions between farmed and wild stocks as a result of Anisakis sp. are unlikely to occur...*”.

Questi dati sembrano quindi mettere in evidenza come le moderne tecniche di allevamento, basate sullo sfruttamento di soggetti riprodotti in cattività e sull’utilizzo di mangimi commerciali, siano in grado di ridurre al minimo il rischio di infestazione da larve di *Anisakis* spp. nelle specie ittiche allevate in gabbia (salmonidi e non salmonidi).

Come ben descritto nella Scientific Opinion dell’EFSA “Risk assessment on parasites in fishery products” (2010), i sistemi di produzione di spigola ed orata presentano caratteristiche simili, che prevedono il predominante utilizzo di sistemi d’allevamento in gabbia il tutto il Bacino del Mediterraneo nonostante sistemi in vasca ed in ambienti lagunari siano stati storicamente importanti e vengano ancora applicati in alcuni paesi.

Nell’analisi dei rischi di contrarre infestazioni da stadi larvali di *Anisakis* spp., vengono analizzati i principali sistemi produttivi di spigola ed orata, fra cui

anche la vallicoltura tipica del territorio italiano, soprattutto lungo le coste orientali settentrionali, e i sistemi “*hosha*” adottati in Egitto, che prevedono il confinamento dei pesci in ambienti naturali sfruttando la migrazione trofica dei giovanili dal mare all’interno di lagune costiere per il ripopolamento e la migrazione autunnale degli adulti verso il mare aperto per la cattura mediante apposite barriere e manufatti. In questi sistemi vallivi la spigola e l’orata sono in genere in policoltura con mugilidi ed anguille e si alimentano in base alla disponibilità trofica naturale dell’ambiente (FAO, 2010).

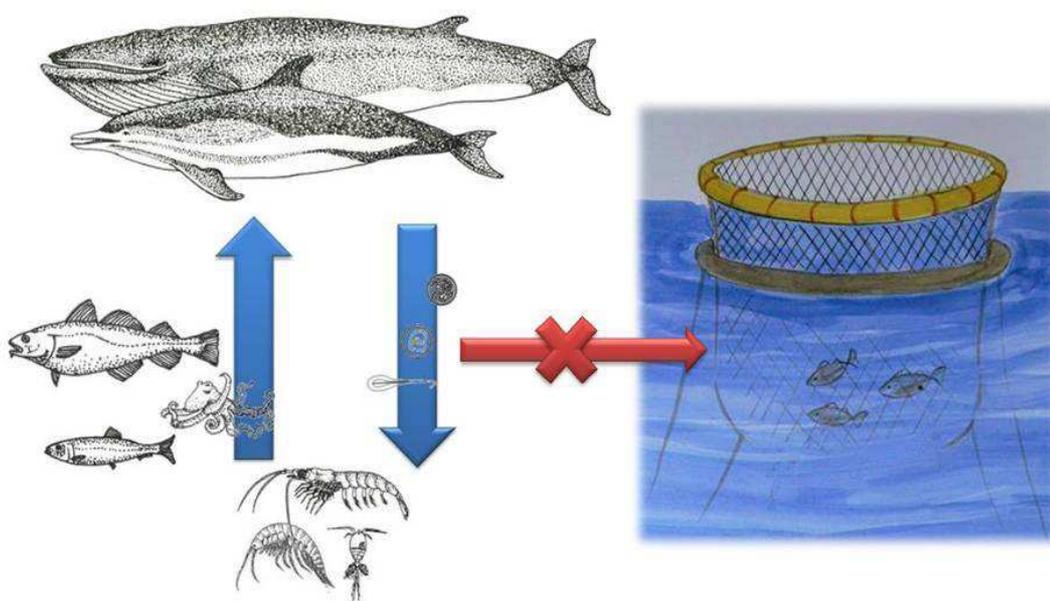


Ciclo produttivo della spigola in sistemi estensivi (FAO, 2010)

Nei sistemi intensivi d’allevamento, gli stadi giovanili (avannotti o pre-ingrassato) prodotti in avannotterie specializzate sono utilizzati per ripopolare le vasche o le gabbie a mare. L’alimentazione si basa sulla somministrazione di mangime commerciale estruso, con razionamento e qualità nutrizionale diversificati in base allo stadio di crescita ed alla temperatura. I sistemi in gabbia possono essere di diversa tipologia (galleggianti, sommergibili, ecc.) e

Al momento sono disponibili poche informazioni scientifiche derivanti da studi specifici volti a rilevare la possibile infestazione con stadi larvali di nematodi Anisakidae di spigole ed orate d'allevamento, se si eccettua lo studio pubblicato da Peñalver *et al.* (2010) ed i dati da noi presentati alla 15th EAFP Conference on Diseases of Fish and Shellfish, European Society of Fish Pathologists (Gustinelli *et al.*, 2011).

Nello schema qui sotto riportato, sono riassunti i fattori principali che renderebbero minimi i rischi di trasmissione di larve di *Anisakis* spp. a spigole ed orate allevate in gabbia.



Fattori che impedirebbero la trasmissione di *Anisakis* spp. a pesci allevati in gabbia:

- avannotti provenienti da avannotterie industriali
- alimentazione con mangime commerciale
- improbabile realizzazione della “food web transmission” tra pesci allevati e ospiti intermedi e/o paratenici di *Anisakis* (crostacei, cefalopodi e pesci selvatici)

A scopo conoscitivo e comparativo, nel corso di questa indagine sono state esaminate per la ricerca di larve di *Anisakis* spp. anche 30 spigole e 30 orate selvatiche pescate con lenza lungo la costa ionica della Grecia (zona antistante a Missolongi).

L'esame parassitologico, condotto mediante osservazione visiva degli organi della cavità addominale e mediante esame visivo diretto / transilluminazione delle porzioni muscolari di tutti gli esemplari, non ha mai evidenziato la presenza di stadi larvali di *Anisakis* spp.

Questo risultato sembra indicare una bassa circolazione di questi parassiti nelle popolazioni selvatiche di questi areali, anche se senz'altro da un punto di vista statistico non rappresenta un dato esaustivo.

Va comunque evidenziato come, sulla base delle attuali conoscenze, l'orata risulti essere un ospite poco suscettibile alle infestazioni da larve Anisakidae, come dimostrato dall'assenza di segnalazioni anche in esemplari selvatici (Mattiucci S., com. pers.).

La spigola potrebbe essere invece un ospite paratenico particolarmente efficace, anche a causa della sua attitudine trofica fortemente predatrice sia su invertebrati (allo stadio giovanile) sia su altri pesci (allo stadio adulto), come dimostrato per spigole selvatiche pescate in areali dell'Atlantico nord-orientale che hanno evidenziato alte prevalenze ed elevate intensità d'infestazione, con presenza di larve di *Anisakis* anche a livello muscolare (Bernardi, 2009; Bernardi *et al.*, 2011).

Per quanto concerne orate e spigole selvatiche del Bacino del Mediterraneo, al momento non sono reperibili dati in letteratura ed andranno quindi condotte indagini volte a definirne il ruolo nell'epidemiologia dell'Anisakiasi in quest'area.

Andranno inoltre condotti ulteriori studi sull'assenza di larve di *Anisakis* spp. in spigole ed orate allevate in sistemi estensivi lagunari, che secondo l'EFSA (2010) potrebbero presentare maggiori rischi, alimentandosi naturalmente e rappresentando gli stadi d'accrescimento di giovanili selvatici.

Non ci sono però dati sulla possibilità di infestazione mediante assunzione di invertebrati e/o vertebrati presenti in acque vallive, che non appaiono comunque ambienti favorevoli per la realizzazione ed il mantenimento del ciclo biologico di *Anisakis* spp. anche in relazione all'assenza dei serbatoio primari della parassitosi, rappresentati da mammiferi marini.

CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

Il grande sviluppo della maricoltura mediterranea registrato negli ultimi anni si è basato non solo sull'ottimizzazione di tecniche produttive e riproduttive preesistenti, ma anche sulla diversificazione delle tipologie d'allevamento e delle specie ittiche allevate. Tale diversificazione produttiva ha comportato profondi mutamenti anche nel panorama delle patologie parassitarie che possono colpire i pesci marini allevati, fino a qualche anno fa studiate soprattutto in rapporto ad ambienti produttivi "a terra". A tal proposito, la presente ricerca ha permesso di ampliare ed aggiornare le conoscenze scientifiche sulla situazione epidemiologica relativa alle malattie parassitarie sostenute da ectoparassiti in spigole ed orate allevate nei diversi sistemi produttivi della maricoltura italiana e greca e di fornire dati epidemiologici indicativi dell'assenza di infestazioni da larve di nematodi Anisakidae zoonosici in spigole e orate allevate in gabbia in Italia ed in Grecia.

In particolare, le attività di ricerca condotte nel corso della presente tesi di Dottorato hanno permesso di conseguire i seguenti risultati:

- ampliare ed aggiornare le conoscenze scientifiche sulla situazione epidemiologica relativa alle malattie parassitarie sostenute da ectoparassiti in spigole ed orate allevate in Italia ed in Grecia;
- definire le prevalenze e l'intensità d'infezione di agenti parassitari patogeni quali *Amyloodinium ocellatum*, *Cryptocaryon irritans*, *Diplectanum aequans*, *Sparicotyle chrysophrii* e di agenti parassitari opportunisti quali *Trichodina* sp., peritrichi sessili e *Cryptobia branchialis*;
- mettere in evidenza il possibile ruolo patogeno di parassiti di nuova introduzione, quali i digenei della famiglia Aporocotylidae, che pur essendo endoparassiti allo stadio adulto possono causare gravi malattie branchiali a seguito dell'eliminazione delle uova/miracidi a livello delle branchie;

-
- delineare la diffusione di ectoparassiti nelle spigole e nelle orate a seconda dei diversi sistemi d'allevamento impiegati, con differenze rilevanti tra le tipologie "a terra" e quelle "in gabbia";
 - valutare mediante esami necroscopici ed osservazioni istologiche la gravità delle lesioni in relazione all'agente parassitario e relativa intensità d'infezione;
 - indicare l'assenza di stadi larvali di nematodi Anisakidae zoonosici del genere *Anisakis* nelle spigole e nelle orate allevate in gabbia in Italia ed in Grecia.

Fra le specie di ectoparassiti evidenziate sia nella spigola che nell'orata, con percentuali di positività ed intensità d'infezione in genere significativamente diverse in relazione a tipologia d'allevamento e categoria di taglia, vanno evidenziati i ciliati parassiti opportunisti del genere *Trichodina* sp., mentre peritrichi sessili e *Cryptobia branchialis* sono stati osservati solo sporadicamente.

In termini generali, gli animali prodotti in sistemi d'allevamento "off-shore" (GFC e GS) hanno mostrato una minore predisposizione alle infezioni parassitarie, soprattutto quando sostenute da parassiti a ciclo diretto con fasi di sviluppo sul fondo (es. *Amyloodinium ocellatum* e *Cryptocaryon irritans*), che sono stati evidenziati solo in allevamenti intensivi a terra ed in impianto a ricircolo.

Gli animali allevati in gabbie galleggianti "in-shore" (GSC) sono risultati invece esposti ad un maggior numero di agenti parassitari a ciclo diretto ed indiretto, e ciò in relazione al minor ricambio idrico ed alla minore distanza dal fondo, sebbene anche in questa tipologia d'allevamento non siano stati osservati agenti patogeni di rilievo quali *A. ocellatum* e *C. irritans*.

Questi parassiti continuano invece a rappresentare temibili patogeni in ambienti d'allevamento a terra, soprattutto in presenza di condizioni favorevoli la loro colonizzazione, quali ad esempio lo scarso ricambio idrico, i sistemi di ricircolo e la scarsa igiene del fondo.

Le caratteristiche strutturali tipiche dell'allevamento intensivo "a terra" si sono poi confermate determinanti nel condizionare l'insorgenza di infezioni sostenute da organismi commensali opportunisti quali *Cryptobia branchialis*, e peritrichi sessili, evidenziati esclusivamente in tali tipologie produttive talvolta con elevata intensità d'infezione.

Anche per quanto concerne alcuni elminti a ciclo diretto, quale in particolare il monogeneo *Diplectanum aequans*, i valori di prevalenza maggiori sono stati riferiti a sistemi produttivi a terra, sia estensivi che intensivi, seppure anche in GSC siano state rilevate percentuali di positività elevate, indicando come la vicinanza tra ospite e fondale possa facilitare la trasmissione dell'infezione a nuovi ospiti. In particolare in Italia si è evidenziata una prevalenza dell'83,1%, probabilmente a seguito dell'introduzione in gabbia di soggetti già fortemente parassitati. Il parassita è stato osservato in Italia anche in spigole allevate in GFC e GS, con prevalenze elevate ma intensità d'infezione bassissime, tali da non determinare alcuna alterazione patologica di rilievo nei pesci infestati.

Per quanto concerne la valutazione degli effetti patogeni dei parassiti nelle specie ittiche esaminate, si è evidenziata la stretta correlazione tra segni clinici, lesioni anatomopatologiche ed istologiche ed intensità d'infezione soprattutto in riferimento a *A. ocellatum*, ciliati peritrichi mobili e sessili ed a monogenei ectoparassiti quali *D. aequans* e *S. chrysophrii*.

In linea generale i risultati di questa ricerca hanno evidenziato un'ampia diffusione di ectoparassiti nelle specie ittiche allevate in Italia ed in Grecia, con differenze rilevanti tra le diverse tipologie d'allevamento e le categorie di taglia. Il rarissimo riscontro di parassiti nei soggetti di peso <10 g ha indicato come l'ambiente di avannotteria da cui tali soggetti provengono rappresenti in genere un ambiente ben controllato da un punto di vista parassitologico, mentre l'immissione nei sistemi produttivi a terra ed in gabbia li espone a patogeni parassitari di diversa natura. Fanno eccezione le orate <10 g esaminate in Grecia e provenienti da un sistema a ricircolo sperimentale, dove il ciliato *Cryptocaryon irritans* è stato osservato con percentuali di positività prossime al 100%.

In riferimento alla filosofia del “*fish health management*”, per cui il raggiungimento delle condizioni ottimali di salute e crescita del pesce allevato si deve basare su una regolazione “proattiva” del rapporto ospite/patogeno/ambiente, l’approfondimento delle conoscenze sulla eziopatogenesi e sulla biologia degli agenti parassitari più diffusi nella maricoltura mediterranea può rappresentare uno strumento utile ad individuare i fattori ambientali e gestionali che possono condizionare tale rapporto, permettendo di intervenire con azioni di profilassi e controllo mirati.

Per quanto concerne i risultati relativi alla ricerca di larve di nematodi Anisakidae zoonotici in spigole e orate allevate in gabbia in Italia ed in Grecia, il mancato reperto di larve di *Anisakis* in tutti gli esemplari esaminati confermano quanto già evidenziato in passato per il salmone atlantico (Angot e Brasseur, 1993; Lunestad, 2003) e, limitatamente ad un unico studio (Peñalver *et al.*, 2010), per spigole ed orate allevate nel Mediterraneo occidentale. I nostri risultati indicherebbero quindi come spigole ed orate d’allevamento dovrebbero essere considerate a bassissimo rischio epidemiologico per la trasmissione di *Anisakis* all’uomo attraverso il consumo di preparazioni a crudo a base di queste specie ittiche.

Questi risultati, oltre ad essere visti come un elemento rassicurante per il consumatore, risultano molto importanti anche dal punto di vista ispettivo e commerciale. Infatti il Regolamento CE 853/04 obbliga gli operatori del settore alimentare a praticare un trattamento di congelamento ad una temperatura non superiore a -20°C in ogni parte della massa per almeno 24 ore oppure, in base al recente Regolamento (CE) N. 1276/2011, a -35°C per 15 ore, per i prodotti ittici (sia di pesca sia d’acquacoltura) che saranno consumati crudi o poco cotti, nonché per i prodotti di alcune specie (aringhe, sgombri, spratti, salmoni selvatici dell’Atlantico e del Pacifico) che devono subire un’affumicatura a freddo con temperature interne che non raggiungono i 60°C e per i prodotti ittici marinati e/o salati se il trattamento praticato non garantisce la distruzione delle larve di nematodi. Lo stesso Regolamento specifica che gli operatori del settore alimentare possono andare in deroga ai trattamenti di cui sopra qualora i dati

epidemiologici disponibili indicano che i prodotti ittici (zone di pesca/allevamento) non presentano rischi sanitari riguardo la presenza di parassiti e qualora le Autorità competenti lo autorizzino. In conseguenza a ciò, l'assenza di *Anisakis* nelle orate e nelle spigole allevate in gabbia nel Mediterraneo rappresenta un dato interessante sia per le implicazioni sanitarie dirette sia per i risvolti di ordine commerciale ed economico.

BIBLIOGRAFIA

- Abollo E., D'Amelio S., Pascual S.(2001). Fitness of the marine parasitic nematode *Anisakis simplex* s. str in temperate waters of the NE Atlantic. *Disease of Aquatic Organism*, 45. 131-139.
- Ajmerito P., Voghera M., Julini M., Pellegrino C. (1984). Heterocheilidiasi in prodotti ittici. Considerazioni ispettive e prevenzione nell'uomo. *Industrie Alimentari*, 23: 101-106.
- Alvarez-Pellitero P., Barja J.L., Basurco B., Berthe F., Toranzo A.E.. (2004). Report about fish parasitic diseases. In "Options méditerranéennes, Serie B: Etudes et Recherches, Numéro 49; Mediterranean *Aquaculture* Diagnostic Laboratories; CIHEAM Ed.: 103-130.
- Alvarez-Pellitero, P., Sitjà-Bobadilla, A. Franco-Sierra, A. (1993). Protozoan parasites of wild and cultured sea bass, *Dicentrarchus labrax*, from the Mediterranean area. *Aquac. and Fish. Manag.*, 24, 101-108.
- Anderson R.C. (1984). The origins of zooparasitic nematodes. *Canadian Journal of Zoology*, 62, 317-328.
- Anderson R.C. (2000). Nematode parasites of vertebrates: Their development and transmission, 2nd ed. CABI Publishing, New York, New York., p. 650.
- Angot V., Brasseur P. (1993). European farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) are safe from anisakid larvae. *Aquaculture*, 118, 339-344.
- Antonelli L., Quilichini Y., Marchand B., (2010). *Sparicotyle chrysophrii* (Van Beneden and Hesse 1863) (Monogenea: *Polyopisthocotylea*) parasite of cultured Gilthead sea bream *Sparus aurata* (Linnaeus 1758) (Pisces: Teleostei) from Corsica: ecological and morphological study. *Parasitol. Res.* 107, 389–398.
- Athanassopoulou F., Bouboulis D., Martinsen B. (2001). In vitro treatments of deltamethrin against the isopod parasite *Ceratothoa oestroides*, a

pathogen of sea bass *Disentrachus labrax* L. Bull Eur Assoc Fish Patol 21, 26-29.

- Athanassopoulou F., Ragias V., Vagianou St., Di Cave D., Rigos G., Rapathanasiou G., Georgoulakis J. (2005). Report of *Sparicotyle (Microcotyle) chrysophrii* Van Beneden and Hesse 1863, *Atrispinum seminalis* Euzet and Maillard 1973 and *Polylabris tubicirrus* Paperna and Kohn 1964 (Monogenea) on captive sea bream (*Sparus aurata*) and sharp snout sea bream (*Diplodus puntazzo*) in coastal Greece and Italy Audicana M.,
- Balbuena J.A., Karlsbakk E., Kvenseth A.M., Saksvik M., Nylund A. (2000). Growth and emigration of third-stage larvae of *Hysterothilacium aduncum* (Nematoda: Ascaridoidea), in larval herring *Clupea harengus*. *Journal of Parasitology*, 86, 1271-1275.
- Becker C.D.(1977). Flagellate parasites of fishes. In: Parasitic Protozoa. Ed. Krier J. P. Academic Press, New York: 357-413.
- Berland B. (1961). Nematodes from some Norwegian marine fishes. *Sarsia* 2, 1–50.
- Berland B. (1961). Nematodes from some Norwegian marine fishes. *Sarsia*, 2, 1–50.
- Bernardi C. (2009). Preliminary study on prevalence of larvae of Anisakidae family in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Food Control* 20, 433–434.
- Bernardi C., Gustinelli A., Fioravanti M.L., Caffara M., Mattiucci S., Cattaneo P. (2011). Prevalence and mean intensity of *Anisakis simplex* sensu stricto in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) from Northeast Atlantic Ocean. *International Journal of Food Microbiology*, 148, 155-159.
- Berthe F.C.J., Liebana-Criado E., Afonso A. (2009). Food Safety aspects of fish farming systems: a review of EFSA opinions on welfare. 14th EAFP (European Association of Fish Pathologists) Conference, Prague.

-
- Bronzi, P., Rampacci, M., Ugolini, R., (2001). L'acquacoltura intensiva. In: Acquacoltura responsabile. Cataudella S.; Bronzi P., Unimar-Uniprom: 330-336.
 - Brown E.M. (1931). Note on a new species of dinoflagellate from the gills and epidermis of marine fishes. *Proceeding of the Zoological Society of London*, Part 1, 345-346.
 - Brown, E. M. (1951). A new parasitic protozoan the causal organism of a white spot disease in marine fish – *Cryptocaryon irritans* gen. and sp. n. Agenda and Abstracts of the Scientific Meeting of the Zoological Society of London, 1950, 11,1-2.
 - Brown, E. M. (1963). Studies on *Cryptocaryon irritans* Brown, Proceedings of the First International Congress on Protozoology, Prague, 22-31 August 1961, pp. 284-287. Prague: Czechoslovak Academy of Sciences.
 - Brown, L. (ed.). Brown, L. (ed.). (1993). Aquaculture for veterinarians: fish husbandry and medicine. Acquacoltura per i veterinari: allevamento di pesci e la medicina. Pergamon Press Ltd., Oxford, UK. Pergamon Press Ltd., Oxford, UK. 447 pp. 447 pp
 - Bruno D.W., Alderman D.J., Schlotfeldt H.J. (1997). What should I do? A Practical Guide for the Marine Fish Farmer. *Eur. Ass. Fish Pathol.* Ed.: 23-64.
 - Buchmann & Lindenstrøm. (2002): Interactions between monogenean parasites and their fish hosts.
 - Burgess P.J., Matthews R.A. (1995). Fish host range of seven isolates of *Cryptocaryon irritans* (Ciliophora). *J. Fish Biol.*, 46, 727-729.
 - Burgess, P. J. & Matthews, R. A. (1994). *Cryptocaryon irritans* (Ciliophora): Photoperiod and transmission in marine fish. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. 74(3), 535- 542.
 - Bush Albert o., LaffertyKavinD.,LotzJeffrey M., Shostak Allenw. (1997). Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al, revisited.

-
- Caffara M, Quaglio F, Fioravanti ML, Gustinelli A, Marcer F, Moscato M, Caggiano M. (2005). Confezione da Polysporo-plasma *sparis* (Myxozoa) e *Sparicotyle chrysophrii* (Monogenea) in orata (*Sparus aurata*). Atti del XII Convegno Nazionale della Società Italiana di Patologia Ittica: 47.
 - Caffara M., Galuppi R., Giannetto S., Minelli C., Tampieri M.P. (1998). *Sparicotyle* (Microcotyle) *chrysophrii* (Monogenea, Microcotylidae) parasite in Seabream (*Sparus aurata*). *Parassitologia*, 40 (1): 23.
 - Cardia F., Lovatelli A., (2007). A review of cage aquaculture: Mediterranean Sea. In M. Halwart, D. Soto and J.R. Arthur (eds). Cage aquaculture – Regional reviews and global overview, pp. 156-187. FAO Fisheries Technical Paper. No. 498. Rome, FAO. 2007. 240pp.
 - Cataudella S.; Bronzi P., (2001). Acquacoltura responsabile Unimar-Uniprom: 330-336.
 - Cecchini et al., (1998). Influence of temperature on the life cycle of *Diplectanum aequans* (Monogenea, Diplectanidae), parasitic on sea bass, *Dicentrarchus labrax*.
 - Cecchini S., Saroglia M., Cognetti-Varriale A.M., Terova G., Sabino G. (2001). Effect of Low Environmental Temperature on Embryonic Development and Egg Hatching of *Diplectanum aequans* (Monogenea, Diplectanidae) Infecting European Sea Bass, *Dicentrarchus labrax*. *Fish Pathol.*, 36 (1), 33-34.
 - Cecchini, (1994). Influence of temperature on the hatching of eggs of *Diplectanum aequans*, a parasite of sea bass.
 - Chai J.Y., Murell K.D., Lymbery A.J. (2005). Fish-borne parasitic zoonoses: status and issues. *Int. J. Parasitol.* 35, 1233–1254.
 - Cheung P.J., Nigrelli R.F., Ruggieri G.D. (1981). Scanning electron microscopy on *Cryptocaryon irritans* (Brown 1951) a parasitic ciliate in marine fish. *J. Aquaculture*, 2, 70-72.
 - Christofilogiannis Panos (2011). Greek Mariculture 2011: 30 years of experience the cornerstone for building the vision for 2030 IN Aquaculture Europe • Vol. 36 (2) JUNE 2011.

-
- Colorni A. (1985). Aspect of the biology of *Cryptocaryon irritans* and hyposalinity as a control measure in cultured gilt-head sea bream, *Sparus aurata*. *Dis. Aquat. Org.*, 1, 19-27.
 - Colorni A. (1987). Biology of *Cryptocaryon irritans* and strategies for its control. *Aquaculture*, 67, 236-237.
 - Colorni A. (2005). Recenti acquisizioni su *Amyloodinium ocellatum* e *Cryptocaryon irritans*: l'esperienza israeliana. XII Convegno Nazionale Soc. It. Patol. Ittica, Cesenatico (FC) 29-30 settembre-1 ottobre 2005: 36.
 - Colorni A., (1988). New observations on the biology and infection process of *Cryptocaryon irritans*, a pathogen of marine fish. Third International Colloquium on Pathology in Marine Aquaculture. Gloucester Point, Virginia, USA, pp. 39-40. [Abstracts].
 - Colorni A., Diamant A. (1993). Ultrastructural features of *Cryptocaryon irritans*, a ciliate parasite on marine fish. *Eur. J. Parasitol.*, 29, 425-434.
 - Colorni, A. and P. Burgess. (1997). *Cryptocaryon irritans* Brown 1951, the cause of "white spot disease" in marine fish: an update. *Aquarium Sciences and Conservation*, 1, 217–238.
 - Cribb ,T.H.,†Robert D. Adlard ,Craig J. Hayward, Nathan J. Bott, David Ellis,Daryl Evans, Barbara F. Nowak, (2011). The life cycle of *Cardicola forsteri* (Trematoda: Aporocotylidae), a pathogen of ranched southern bluefin tuna, *Thunnus maccoy*.
 - Cruz e Silva MP, Freitas MS, Orge ML.,(1997). Co-infection by monogenetic trematodes of the genus *Microcotyle*, Beneden & Hesse, 1863, *Lamellodiscus ignoratus* Palombi, 1943, the protozoan *Trichodina* sp. Ehrenberg, 1838 and the presence of epitheliocystis, *Vibrio alginolyticus* and *V. vulnificus* in cultured seabream (*Sparus aurata* L.) in Portugal. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* 17, 40–42.
 - Davey J.T. (1971). A revision of the genus *Anisakis* Dujardin, 1845 (Nematoda: Ascaridata). *J. Helminthol.*, 45, 51–72.
 - Deardorff T.L., Overstreet R.N. (1991): *Microbiology of Marine Food Products*. ANAVI Van Nostrand Reihold, New York.

-
- Desdevises, (2001). The phylogenetic position of *furnestinia echeneis* (Monogenea, Diplectanidae) based on molecular data: a case of morphological adaption.
 - Dezfuli Bahram S., Giari L., Simoni E., Manegatti R., Shinn Andrew P., Manera M.,(2006). Gill histopathology of cultured European sea bass, *Disentrarchus labrax* (L.), infected with *Diplectanum aequans* (Wagener 1857) Diesing 1958 (Diplectanidae: Monogenea).
 - Dick T.A., Choudhury A. (1995). Phylum Nematoda. In: Fish Diseases and Disorders. Vol. I Protozoan and Metazoan Infections, P.T.K. Woo (Ed.) CAB Intern., Wallingford, UK, Vol 1. Pp. 415-437.
 - Dick T.A., Choudhury A. (1995). Phylum Nematoda. In: Fish Diseases and Disorders. Vol. I Protozoan and Metazoan Infections, P.T.K. Woo (Ed.) CAB Intern., Wallingford, UK, Vol 1. Pp. 415-437.
 - Dickerson H.W., Dawe D.L. (1995). *Ichthyophthirius multifiliis* and *Cryptocaryon irritans* (Phylum Ciliophora). In: Fish Diseases and Disorders. Volume 1 Protozoan and Metazoan Infections. Ed. Woo P.T.K. Cab International, Wallingford, Uk: 1- 122.
 - DIPNET “Disease interactions and pathogen exchange between farmed and wild aquatic animal populations - A European network”. Review of disease interactions and pathogen exchange between farmed and wild finfish and shellfish in Europe Full-length report with bibliography. pp. 124-127;
 - Domingues e Boeger, (2008). Monogenoids (Diplectanidae, Polyonchoinea) from the gills of mojarras (Perciformes, Gerreidae) with the resurrection of *Neodiplectanum* Mizelle & Blatz, 1941 and the proposal of *Darwinoplectanum* n. gen. ectoparasites of the gilthead sea bream *Sparus aurata*. Mar. Biol. 112, 43–47.
 - EFSA (2008). Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards on a request from European Commission on Food Safety considerations of animal welfare aspects and husbandry systems for farmed fish. *The EFSA Journal* (2008) 867, 1-24

-
- EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ); Scientific Opinion on risk assessment of parasites in fishery products. *EFSA Journal* 2010; 8(4): 1543 [91 pp.]. doi:10.2903/j.efsa.2010.1543.
 - Fagerholm H.P. (1991). Systematic implications of male caudal morphology in ascaridoid nematode parasites. *Syst. Parasitol.*, 19, 215–228.
 - Faisal M., Iman, E.A., (1990). *Microcotyle chrysophrii* (Monogenea: Polyopisthocotylea), a pathogen of cultured and wild gilthead seabream, *Sparus aurata*. In: Perkins, F.O., Cheng, T.C. (Eds.), *Pathology in Marine Science*. Academic Press, San Diego, CA, pp. 283–290
 - FAO (2010). Cultured Aquatic Species Fact Sheet. Cultured Aquatic Species Information Programme (CASIP).
 - Ferguson H. W., (2006). Systemic pathology of fish. A text and atlas of comparative tissue responses in diseases of teleosts. Book *Systemic Pathology of Fish: A Text and Atlas of Normal Tissue Responses in Teleosts, and Their Responses in Disease* . p. 263 pp.
 - Fioravanti ML, Caffara M, Florio D, Gustinelli A, Marcer F, Quaglio F (2006). Parasitic diseases of marine fish epidemiological and sanitary considerations. *Parassitologia* ,46(2006), pp.15-18
 - Fioravanti, M.L., Caffara, M., Florio, D., Gustinelli, A. and Marcer, F., (2006). A parasitological survey of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) cultured in Italy. *Veterinary Research Communications*, 30 (Suppl. 1), 249–252
 - Giavenni R. (1983). Parassitosi sostenuta da *Diplectanum aequans* (Wagner 1857) in branzino (*Dicentrarchus labrax*) di allevamento. *Riv. It. Piscicoltura Ittiopatol.*, XVIII, 4, 167-176.
 - Gonzalez-Lanza C, Alvarez-Pellitero P, Sitja-Bobadilla A (1991). Diplectanidae (Monogenea) infestations of sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.), from the Spanish area. Histopathology and population dynamics under culture conditions. *Parasitol Res* 77, 307–314
 - Gustinelli A., Kapota A., Rigos G., Fioravanti M.L. (2011). Zoonotic risks in mariculture: a survey of *Anisakis* larvae occurrence in caged fish from

Greece and Italy. Abstract Book of 15th EAFP Conference on Diseases of fish and shellfish, European Society of Fish Pathologists, Split, Croatia, September 12-16 2011, p. 425.

- Hafsteinsson H., Rizvi S.S. (1987). A review of the sealworm problem: biology, implications and solutions. *Journal of Food Protection*, 50, 70-84.
- Hartwich G. (1974). Keys to genera of the Ascaridoidea. In “CIH keys to the Nematode Parasites of Vertebrates” (R.C. Anderson, A.G. Chabaud, and S. Wimott, eds.), p. 153
- Hayward, C.J., Aiken, H.M., Nowak, B.F., (2007). Metazoan parasites on gills of SouthernBluefin Tuna (*Thunnus maccoyii*) do not rapidly proliferate after transfer to seacages. *Aquaculture* 262, 10–16.
- Hojgaard D.P. (1999). Food and parasitic nematodes of saithe, *Pollachius virens*, from the Faroe Island. *Sarsia*, 84, 473-478.
- Holzer, A. S., F. E. Montero, A. Repulle ´s, M. J. Nolan, A.Sitja-Bobadilla, P. Alvarez-Pellitero, C. Zarza, and J. A. Raga. (2008). *Cardicola aurata* sp. n. (Digenea:Sanguinicolidae) from Mediterranean *Sparus aurata* L. (Teleostei: Sparidae) and its unexpected phylogenetic relationship with *Paradeontacylix McIntosh*, 1934. *Parasitology International* 57, 427–482.
- Hsiu-hui Shih, Chen-Chn Ku, Chun-Shun Wang (2010). *Anisakis simplex* (Nematoda: Anisakidae) third-stage larval infections of marine cage cultured cobia, *Rachycentron canadum* L., in Taiwan.
- Huff J. A., Burns C. D. (1981). Hypersaline and chemical control of *Cryptocaryon irritans* in red snapper, *Lutjanus campechanus*, monoculture. *Aquaculture*, 22, 181-184.
- Iglesias L., Valero A., Benitez R., Adroher F. J. (2001). In vitro cultivation of *Anisakis simplex*: pepsin increases survival and moulting from fourth to adult stage. *Parasitology*, 123, 285-291.
- Inoue K, Oshima SI, Hirata T, Kimura I (2000). Possibility of anisakid larvae infection in farmed salmon. *Fish. Science*, 66, 1049–1052.
- Justine j.-l., BriAnD m.j. (2010). Three new species, *Lamello-discus tubulicornis* n. sp., *L. magnicornis* n. sp. and *L. parvi-cornis* n. sp.

-
- (Monogenea: Diplectanidae) from *Gymnocranius* spp. (lethrinidae: Monotaxinae) off New Caledonia, with the proposal of the new morphological group 'tubulicornis' within *Lamellodiscus* Johnston & Tiegs, 1922. *Parasitol.* 75, 159–179.
- Karl H., Baumann F., Ostermeyer U., Kuhn T., Klimpel S. (2011). *Anisakis simplex* (s.s.) larvae in wild Alaska salmon: no indication of post-mortem migration from viscera into flesh. *Dis. Aquat. Org.*, 94, 201–209.
 - Karlsbakk E., Otterlei E., Hoie H., Nylund A. (2001): Parasites of cultured cod (*Gadus morhua*) postlarvae fed natural zooplankton. *Bulletin of European Association of Fish Pathologists*, 21, 63-70.
 - Kennedy M.W. (2008). *Anisakis simplex*: from obscure infectious worm to inducer of immune hypersensitivity. *Clin. Microbiol. Rev.* 21, 360–379.
 - Klimpel S., Palm H.W., Ruckert S., Piatkowski U. (2004). The life cycle of *Anisakis simplex* in the Norwegian Deep (Northern North Sea). *Parasitology Research*, 94, 1-9.
 - Køie M. (1982) .The redia, cercaria and early stages of *Aporocotyle simplex* Odhner, 1900 (Sanguinicolidae) a digenetic trematode which has a polychaete annelid as the only intermediate host. *Ophelia* 21(2), 115–145.
 - Køie M. (1993). Aspect of the life cycle and morphology of *Hysterothylacium aduncum* (Rudolphi, 1802) (Nematoda: Ascaridoidea, Anisakidae). *Canadian Journal of Zoology*, 71, 1289-1296.
 - Køie M.(2001). Experimental infections of copepods and sticklebacks *Gasterosteus aculeatus* with small ensheathed and large third-stage larvae of *Anisakis simplex* (Nematoda, Ascaridoidea, Anisakidae). *Parasitology Research*, 87, 32-36
 - Køie M., Berland B., Burt M.D.B. (1995), Development of the third- stage larvae occurs in the eggs of *Anisakis simplex* and *Pseudoterranova decipiens* (Nematoda, Ascaridoidea, Anisakidae). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 52, 134-139

-
- K ie M., Fagerholm H.P. (1993). Third-stage larvae emerge from eggs of *Contracaecum osculatum* (Nematoda: Anisakidae). *Journal of Parasitology*, 79, 777-780.
 - Kuperman, B.I., Matey, V.E., (1999). Massive infestation by *Amyloodinium ocellatum*(Dinoflagellida) of fish in a highly saline lake, Salton Sea, California, USA. *Dis. Aquat.Org.* 39, 65–73.
 - Kuperman, B.I., Matey, V.E., and S.H. Hurlbert. (2001). Parasites of fish from the Salton Sea, California, USA. *Hydrobiologia*, 466, 195-208.
 - Laffon-Leal S.M., Vidal-Martinez V.M., Arjona-Torres G. (2000). “Cebiche”—a potential source of human anisakiasis in Mexico? *J. Helminthol.*, 74, 151–154.
 - Lauckner G. (1984). Diseases caused by protophytans (algae). In: *Diseases in Marine Animals*. Ed. Kinne O. Biologische Anstalt Helgoland, Hamburg, Vol. IV, Part 1, 169-180.
 - Lawler A.R. (1980). Studies on *Amyloodinium ocellatum* (Dinoflagellata) in Missisipi Sound: natural and experimental host. *Gulf Research Reports*, 6, 403-413.
 - Lom J. (1995). Trichodinidae and other Ciliates (Phylum Ciliophora). In: *Fish Diseases and Disorder*. Vol. 1. Protozoan and Metazoan Infection. Ed. Woo P.T.K. Cab International, Wallingford, UK: 229-262.
 - Lom J., Dyková I. (1992). Protozoan parasites of fishes. *Development in aquaculture and Fisheries Science*, volume 26. Elsevier Science Publiser B.V., Amsterdam Olanda.
 - Lom J., Lawler A. R. (1973). An ultrastructural study on the mode of attachment in dinoflagellates invading the gill of Cyprinodontidae. *Parasitologica*, 9, 293-309.
 - Lunestad B.T. (2003). Absence of nematodes in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in Norway. *J. Food Prot.* 66, 122-124.

-
- Marty G.D. (2008). Anisakid larva in the viscera of a farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 279, 209–210.
 - Massa F., Rampacci M., Ugolini R (2000). L'acquacoltura responsabile. In: Un mare di risorse. Introduzione alla conservazione ed alla gestione delle risorse ittiche. Ed. Cataudella S., Carrada G.C. Stampa Tipolitografia Sat, Gesp s.r.l. Città di Castello. Pp. 143-201.
 - Matthews B. F., Matthews R. A., Burgess P. J. (1993). *Cryptocaryon irritans* (Brown 1951) (Ichthyophthiriidae): the ultrastructure of the somatic cortex throughout the life cycle. *J. Fish Dis.* 16, 339-349.
 - Mattiucci S., Nascetti G. (2006). Molecular systematics, phylogeny and ecology of anisakid nematodes of the genus *Anisakis* Dujardin, 1845: An update. *Parasité*, 13, 99–113.
 - Mattiucci S., Nascetti G. (2008). Advances and trends in the molecular systematics of anisakid nematodes, with implications for their evolutionary ecology and host–parasite co-evolutionary processes. *Adv. Parasitol.* 66, 47–148.
 - Mattiucci S., Nascetti G., Dailey M., Webb S.C., Barros N., Cianchi R., Bullini L. (2005). Evidence for a new species of *Anisakis* Dujardin, 1845: Morphological description and genetic relationships between congeners (Nematoda: Anisakidae). *Syst. Parasitol.*, 61, 157–171.
 - Mattiucci S., Paggi L., Nascetti G., Abollo E., Webb C., Pascual S., Cianchi R., Bullini L. (2001). Genetic divergence and reproductive isolation between *Anisakis brevispiculata* and *Anisakis physeteris* (Nematoda: Anisakidae). *Int. J. Parasitol.*, 31, 9–14.
 - Mattiucci S., Paoletti M., Webb S.C. (2009). *Anisakis nascettii* n. sp. (Nematoda: Anisakidae) from beaked whales of the southern hemisphere: morphological description, genetic relationships between congeners and ecological data. *Syst. Parasitol.*, 74, 199–217.
 - McClelland G., Martell D.J. (2001). Surveys of larval sealworm (*Pseudoterranova decipiens*) infection in various fish species sampled from Nova Scotian waters between 1988 and 1996, with an assessment of

examination procedures. In: Desportes, G., and McClelland, G., eds. Sealworms in the North Atlantic: Ecology and Population Dynamic Tromsø, Norway: North Atlantic Marine Mammal Commission.

- Mladineo I. (2002a). prevalence of *Ceratothoa oestroides* (Risso, 1826), a cymothoid isopod parasite, in cultured sea bass *Discentrarchus labrax* L. on two farms in the middle Adriatic Sea. *Acta Adriat* 43, 97-102.
- Mladineo I. (2003). Life cycle of *Ceratothoa oestroides*, a cymothoid isopod parasite from sea bass *Discentrarchus labrax* L. and sea bream *Sparus aurata*.
- Mladineo I. (2005). Check list of the parasitofauna in Adriatic sea cage-reared fish. *Acta Veterinaria*, 56, 285-292.
- Mladineo I., Zilic J., Cankovic M. (2008). Health survey of Atlantic Bluefin Tuna, *Thunnus thynnus* (Linnaeus, 1758), reared in Adriatic cages from 2003 to 2006. *Journal of the World Aquaculture Society*, 39, 281-289.
- Moller H., Anders K. (1986). Diseases and parasites of marine fishes. Verlag Moller: 1-365.
- Myers B. J. (1976b): Research then and now on the *anisakidae* nematodes. *Transactions of American Microscopy Society*, 95, 137-142.
- Nigrelli R.F., Ruggieri G.D. (1966). Enzootics in the New York Aquarium caused by *Cryptocaryon irritans* (Brown 1951) a histophagous ciliate in the skin, eyes and gills of marine fish. *Zoologica: New York Zoological Society*, 51, 97-102.
- Noga E.J. (1987). Propagation in cell culture of the dinoflagellate *Amyloodinium*, an ectoparasite of marine fish. *Science*, 236, 1302-1304.
- Noga E.J. (1995). Diagnosis and treatment. In: *Fish disease*, 1st ed., Ed. Mosby, P.p. 367.
- Noga E.J. (1996). *Fish Disease: Diagnosis and Treatment* (ed. By S.T. Louis). North Carolina State University, Mosby, Missouri: 139-162.
- Noga E.J. and Levy M.G. (1995). Dinoflagellida (Phylum Sarcocystidophora) In: P. T. K. Woo (ed.) *Fish Diseases and Disorders*.

Volume 1: Protozoan and Metazoan Infections. CAB International, Wallingford, Oxon. pp 1-25.

- Noga E.J., Bower C.E. (1987). Propagation of the marine dinoflagellate *Amyloodinium ocellatum* under germ-free conditions. *J. Parasitol.*, 73, 924-928.
- Ogawa K, Yokoyama H (1998). Parasitic diseases of cultured marine fish in Japan. *Fish Pathol.* 33, 303-309.
- Oliver G (1982). *Microcotyle chrysophrii* Van Beneden et Hesse, 1863 (Monogenea, Polyopisthocotylea, Microcotylidae) parasite de *Sparus aurata* Linneaus, 1758 (Teleostei, Sparidae) dans les étangs littoraux du Languedoc-Roussillon (France). *Parasitologie*, pp 113–118
- Oliver G. (1977). Effet pathogène de la fixation de *Diplectanum aequans* (Wagner, 1857) (Monogenea, Monopisthocotylea, Diplectanidae) sur les branchies de *Dicentrarchus labrax* (Linneaus, 1758) (Pisces Serranidae). *Z. Parasitkde*, 52 (2), 7-11.
- Orecchia P., Paggi L. (1978). Aspetti di sistematica e di ecologia degli elminti parassiti di pesci marini studiati presso l'Istituto di parassitologia dell'Università di Roma. *Parassitologia*, 20 (1-2-3), 73-89.
- PADRÓS F., CRESPO S. 1995, Proliferative epitheliocystis associated with monogenean infection in juvenile sea bream *Sparus aurata* in the North East of Spain. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* 15, 42–44.
- Padrós F., Zarza C., Crespo S. (2001). Histopathology of cultured sea bream *Sparus aurata* infected with sanguinicolid trematodes. *Dis. Aquat. Org.*, 44, 47-52.
- Panebianco A., Lo Schiavo A. (1984): Ricerca di larve Anisakidi in pesci marini. *Atti della Società Italiana delle Scienze Veterinarie*, 28, 662-665.
- Paperna I, Colorni A, Gordin H, Kissil GW (1977). Diseases of *Sparus aurata* in marine culture at Elat. *Aquaculture* 10, 195–213
- Paperna I. (1980a). Disease of cultured warm water marine fish. *Int. Counc. Explor. Sea. Special Meeting on disease of Commercially Important Marine Fishes and Shellfish*, Copenhagen: 25.

-
- Paperna I. (1980b). Amyloodinium ocellatum (Brown 1931) (Dinoflagellida) infestations in cultured marine fish at Eliat, Red Sea: epizootiology and pathology. *J. Fish Dis.*, 3, 363-372.
 - Paperna I. (1984). Reproduction cycle and tolerance to temperature and salinity of Amyloodinium ocellatum (Brown 1931) (Dinoflagellida). *Ann. Parasitologie Humaine et Comparée*, 59, 7-30.
 - Parasitol. 30, 305–320.
 - Peñalver J., Maria Dolores E., Muñoz P. (2010). Absence of Anisakid larvae in farmed European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) and Gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) in Southeast Spain. *J. Food Prot.* 73, 1332–1334.
 - Pereira J.C., Abrantes I., Martins I., Barata J., Frias P., Pereira I., (2011). Ecological and morphological features of Amyloodinium ocellatum occurrences in cultivated gilthead seabream Sparus aurata L.; A case study. *Aquaculture*, 310, 289–297
 - Planas, E., (2006). Principales enfermedades parasitarias en el cultivo de peces de esteros. Prevención y tratamiento. In: de Andalucía, Junta(Ed.), Consejería de Agricultura y Pesca, III Jornadas de Acuicultura en el Litoral Suratlántico, *Forma Animada S.L.L*, Spain, pp. 97–98.
 - Radujcovic B.M., Raibaut A. (1989). Parasites des poissons marins du Montenegro: Copepodes. *Acta Adriatica*, 30 (1/2), 237-278.
 - Radujković B.M., Euzet L. (1989). Parasites des poissons du Montenegro: Monogenes. *Acta Adriatica*, 30 (1/2), 51-135.
 - Reversat, J., Silan, P., Maillard, C., (1992). Structure of monogenean populations,
 - Rigos G., Katharios P. (2010). Pathological obstacles of newly-introduced fish species in Mediterranean mariculture: a review. *Rev Fish Biol Fisheries*, 20, 47–70.
 - Rigos G., Pavlidis M., Divanach P. (2001). Host susceptibility to Cryptocarion sp. infection of Mediterranean marine broodfish held under

-
- intensive culture conditions. a case report. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 21, 33-36.
- Robertsen G, Olstad K, Plaisance L, Bachmann L, Bakke TA (2008). *Gyrodactylus salaris* (Monogenea, Gyrodactylidae) infections on resident Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) in southern Norway. *Environ Biol Fish* 83, 99–105
 - Rogers W.A. (1971). Disease in fish due to the protozoan *Epistylis* (Ciliata: Peritrichia) in the Southeastern U.S. *Proc. 25th Ann. Conf. South. Assn. Game Fish Comm.*: 493-496.
 - Sanz F. (1992). Mortality of cultured seabream (*Sparus aurata*) caused by an infection with a trematode of the genus *Microcotyle*. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 12 (6), 186-188.
 - Scholz T. (1999). Parasites in cultured and feral fish. *Veterinary Parasitology* 84, 317–335
 - Silan P., Maillard C. (1986). Modalites de l'infestation per *Diplectanum aequans*, monogene ectoparasite de *Dicentrarchus labrax* en aquiculture. Elements d'epidemiologie et de prophylaxie. In: Pathology in Marine Aquaculture n. 9. Ed. Vivares C.P., Bonami J.R., Jaspers E. Special Publication, *European Aquaculture Society, Bredene, Belgium*: 139-152.
 - Sitjà-Bobadilla A., De Felipe M.C., Alvarez-Pellitero P. (2006). *In vivo* and *in vitro* treatments against *Sparicotyle chrysophrii* (Monogenea: Microcotylidae) parasitizing the gills of gilt-head sea bream (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture* 261, 856–864.
 - Smith J.W. (1983): *Anisakis simplex* (Rudolphi, 1809, det. Krabbe, 1878) (Nematode: Ascaridoidea): morphology and morphometry of larvae from euphasiids and fish. A review of life history and ecology. *Journal of Helminthology*, 57: 205-224.
 - Smith J.W., Wootten R. (1978). *Anisakis* and anisakiasis. *Adv. Parasitol.*, 16, 93–163.
 - Sterud E. (2002). Parasites of wild sea bass *Dicentrarchus labrax* from Norway.

-
- Ugland K.I., Stromnes E., Berland B., Aspholm P.E. (2004). Growth, fecundity and sex ratio of adult whaleworm (*Anisakis simplex*; Nematoda, Ascaridoidea, Anisakidae) in three whale species from the North-Est Atlantic. *Parasitology Research*, 92, 484-499.
 - Vagianou S., Athanassopoulou F., Ragias V., Di Cave D., Leontides L. & Golomazou E. (2006). Prevalence and pathology of ectoparasites of Mediterranean sea bream and sea bass reared under different environmental and aquaculture conditions. *Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh* 58, 78–88.
 - Vagianou S., Bitchava C., Yagnisi M., Athanassopoulou F. (2009). Study of biological cycle of the isopod *Ceratothoa oestroides*, Risso, 1836 in sea bream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*).
 - Valentini A., Mattiucci S., Bondanelli P., Webb S.C., Mignucci-Giannone A., Colom-Llavina M.M., Nascetti G. (2006). Genetic relationships among *Anisakis* species (Nematoda: Anisakidae) inferred from mitochondrial cox2 sequences, and comparison with allozyme data. *J. Parasitol.*, 92, 156–166.
 - Valinas B., Lorenzo S., Eiras A., Figueiras A., Sanmartin M.L., Ubeira F.M. (2001). Prevalence of and risk factors for IgE sensitization to *Anisakis simplex* in a Spanish population. *Allergy*, 56, 667-671.
 - Whittington, I.D., Cribb, B.W., Hamwood, T.E., Halliday, J.A., (2000). Host-specificity of monogenean (platyhelminthes) parasites: a role for anterior adhesive areas? *Int. J.*
 - Wilke D.W., Gordin H. (1969). Outbreak of Cryptocaryoniasis in marine aquaria at Scripps Institute of Oceanography. *California Fish and Game*, 55, 227-236.
 - Winger AC, Kanck M, Kristoffersen R, Knudsen R (2008) .Seasonal dynamics and persistence of *Gyrodactylus salaris* in two riverine anadromous Arctic charr populations. *Environ Biol Fish* 83, 117
 - Yamaguti S. (1971): *Systema Helminthum*. Vol. III. The Nematodes of Vertebrates. Interscience Publ. Inc., New York, USA.

-
- Yanong, Roy, P.E. (2009). Cryptocaryon irritans infections (marine white spot disease) in fish. FA 164. IFAS extensions. University of Florida: 1-10
 - Yemmen C., Ktari M.H., Bahri S. (2011). Seasonality and histopathology of *Trichodina puytoraci* Lom, 1962, a parasite of flathead mullet (*Mugil cephalus*) from Tunisia. *Acta Adriatica*, 52(1), 15-20
 - Yoshinaga T., Dickerson H. W. (1994). Laboratory propagation of *Cryptocaryon irritans* (Brown 1951) on saltwater-adapted black mollies (*Poecilia latipinna*). *J. Aquat. Animal Health*, 6, 197-201.

Protocollo Operativo Standard
CONDUZIONE DELL'ESAME NECROSCOPICO
IN SPECIE ITTICHE MARINE

INDICE

- 1. SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE**
- 2. RIFERIMENTI**
- 3. DEFINIZIONI E ABBREVIAZIONI**
- 4. QUALIFICA DEL PERSONALE**
- 5. PARAMETRI AMBIENTALI**
- 6. MATERIALE E APPARECCHIATURE DA UTILIZZARE**
- 7. MODALITA' OPERATIVE**
- 8. INDICAZIONI PER LA PRESENTAZIONE DEI RISULTATI DI PROVA**
- 9. PRESCRIZIONI DI SICUREZZA**
- 10. PRESCRIZIONI AMBIENTALI**

ALLEGATO 1 - Scheda Esame Necroscopico**1. SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE**

Il presente Protocollo Operativo ha lo scopo di descrivere le procedure utili ad effettuare l'esame necroscopico in specie ittiche marine al fine di rilevare la presenza di alterazioni patologiche. Questa procedura si applica a tutte le specie ittiche marine che vengono sottoposte ad analisi presso il Laboratorio di Prova di Ittiopatologia.

2. RIFERIMENTI

- 2.1 "Fish Disease - Diagnosis and Treatment", Noga E.J., Mosby, St. Louis USA, 1996
- 2.2 "Fish Pathology", 2nd Ed., Roberts R.J., Baillière Tindall, London UK, 1989
- 2.3 "Tecnologia e Patologia in Acquacoltura. Vol. 2", Ghittino P., Tipografia Emilio Bono, Torino, 1985
- 2.4 "Fish Diseases. Vol. I", Schaperclaus W., Eds Schaperclaus W, Kulow H., Schreckenbach K. A.A. Balkema, Rotterdam, 1992
- 2.5 "Aquaculture for Veterinarians: fish husbandry and medicine", Brown L., Pergamon Press, Oxford U.K.,
- 2.6 RAC BIBLIO ITT VI PIANO
- 2.7 SOP MIPAV 10.02.01 "Gestione del sistema di accettazione del Servizio MIPAV"
- 2.8 SOP MIPAV ITT 10.02.01 "Gestione del campione presso il laboratorio di prova di Ittiopatologia"
- 2.9 SOP MIPAV 09.01.01 "Smaltimento dei rifiuti biologici e gestione del materiale contaminato"

3. DEFINIZIONI E ABBREVIAZIONI

3.1 Specie ittiche marine: tutti i pesci d'acqua salmastra o salata provenienti da allevamento estensivo o intensivo o da acque libere

3.2 Esame necroscopico: esame e descrizione sistematica di una carcassa mediante dissezione al fine di determinare la presenza di eventuali alterazioni patologiche.

3.3 Scheda Esame Necroscopico: scheda su cui vengono annotate tutte le alterazioni patologiche evidenziate nel corso dell'esame necroscopico (vedi Allegato 1).

4. QUALIFICA DEL PERSONALE

Personale docente e tecnico afferente al Laboratorio di Prova di Ittiopatologia, nonché personale non strutturato autorizzato dal Responsabile di Laboratorio di Ittiopatologia e preventivamente addestrato all'esecuzione delle procedure.

5. PARAMETRI AMBIENTALI

N.A.

6. MATERIALI ED APPARECCHIATURE DA UTILIZZARE

6.1 Materiali

Bacinelle in plastica / Guanti in gomma / Guanti in lattice monouso / Forbici in acciaio inox di varie dimensioni / Pinze anatomiche e chirurgiche in acciaio inox di varie dimensioni / Lame da bisturi / Manico porta lama in acciaio inox / Soluzione fisiologica (0,85% NaCl) / Pipette pasteur in plastica monouso / Aghi da dissezione / Capsule petri in plastica monouso di diverso diametro / Carta assorbente / Anestetico (MS 222 - Tricaine Methanesulfonate - Sigma) / Scheda esame necroscopico

6.2 Apparecchiature

Stereomicroscopio

7. MODALITÀ PER L'ESECUZIONE DELLA PROVA

7.1 Accettazione del campione

All'arrivo in Laboratorio ogni campione va sottoposto a procedura di accettazione come da SOP MIPAV 10.02.01 "Gestione del sistema di accettazione del Servizio MIPAV" e SOP MIPAV ITT 10.02.01 "Gestione del campione presso il laboratorio di prova di Ittiopatologia".

7.2 Preparazione del campione

7.2.1 Quando il campione perviene al Laboratorio di Prova MIPAV ITT vivo, è necessario sottoporlo ad eutanasia. Nel caso si tratti di soggetti di piccole dimensioni si opera mediante immersione degli stessi in una soluzione acquosa allo 0,1 ‰ di anestetico (100 mg di MS 222 in 1 litro di *aqua fontis*) per 5 minuti. Nel caso si tratti di soggetti di medie o grandi dimensioni si procede alla nebulizzazione sulle branchie di una soluzione di anestetico alla stessa concentrazione. In entrambi i casi, prima di procedere alla necropsia, eseguire la spinalizzazione mediante recisione del midollo allungato, penetrando con un ago o una forbice affilata a livello dell'incisura superiore degli opercoli fino a recidere il midollo allungato a livello dell'emergenza dalla scatola cranica.

7.2.2 Quando il campione perviene al Laboratorio già deceduto, è conveniente procedere all'esecuzione immediata dell'esame necroscopico in modo che il sopraggiungere delle alterazioni post-mortem non interferisca in modo significativo con la corretta conduzione dell'esame necroscopico. Nel caso ciò non fosse possibile, il campione va conservato a temperatura di refrigerazione (5°C ±3) ed osservato comunque entro 24 ore (vedi SOP MIPAV ITT 10.02.01).

7.2.3 Quando il campione perviene al Laboratorio congelato, fissato in formalina o fissato in alcool non è possibile procedere all'effettuazione dell'esame necroscopico ma solo di analisi consentite da tali modalità di conservazione: il materiale ittico congelato o fissato in alcool può essere sottoposto ad esame parassitologico volto alla ricerca di spore di Myxozoa e Microspora e di elminti o per PCR; il materiale ittico fissato in formalina può essere processato per l'esecuzione di esami istologici.

7.3 Esecuzione dell'esame necroscopico

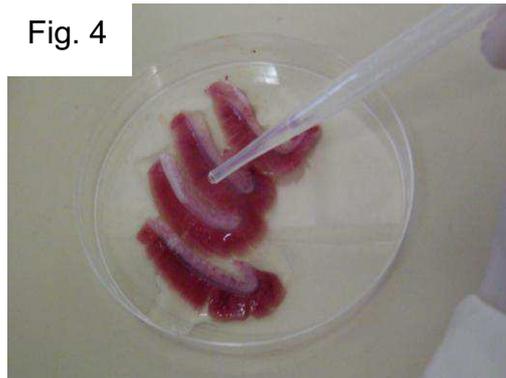
- Procedere al rilevamento della lunghezza totale e del peso di ogni soggetto (Fig. 1), annotandoli poi sul registro di laboratorio e sulla Scheda Esame Necroscopico;

Fig. 1

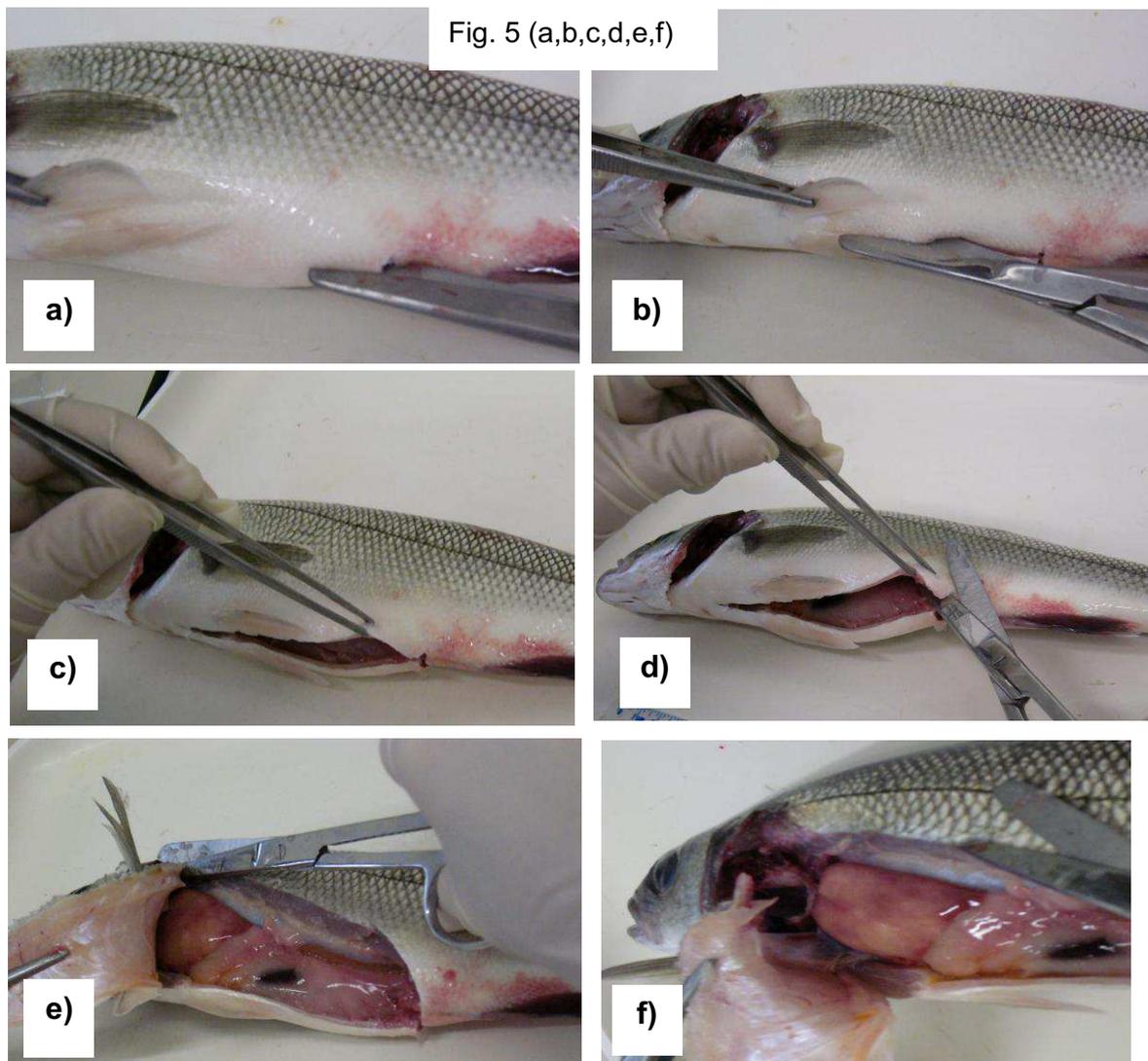


- Porre il campione in esame in una bacinella di plastica lavabile.
- Condurre un attento esame visivo della superficie corporea, delle pinne, degli opercoli, delle fossette nasali, degli occhi, della cavità bucca Fig. 2 per verificare la presenza di eventuali alterazioni patologiche.
- Asportare gli opercoli praticando con le forbici un taglio alla loro base d'impianto (Fig.2) ed esaminare gli archi branchiali *in situ*, verificando la presenza d'eventuali alterazioni patologiche.
- Osservare la superficie interna dell'opercolo asportato e verificare la presenza di eventuali alterazioni patologiche.
- Asportare tutti gli archi branchiali, recidendoli con le forbici a livello delle loro inserzioni laterali (Fig. 3), quindi porli in capsula petri aggiungendo soluzione fisiologica (Fig. 4). Verificare l'eventuale presenza d'alterazioni patologiche negli archi branchiali asportati.





- Osservare le pareti della camera branchiale da cui sono stati asportati gli archi branchiali verificando l'eventuale presenza di alterazioni patologiche.
- Aprire la cavità corporea (Fig. 5) eseguendo con le forbici due linee di taglio: una longitudinale lungo la linea ventrale a partire da un occhietto aperto anteriormente all'apertura anale (5a) fino alla regione opercolare inferiore (5b,c), prestando attenzione a non recidere l'intestino, ed una a partire dall'ano e procedendo in senso antero-dorsale (5d), seguendo la curvatura della cavità addominale e terminando a livello dell'incisura superiore dell'opercolo (5e).
- Asportare la parete addominale tagliando il lembo compreso tra gli estremi delle due linee di taglio (5f).



- Osservare gli organi *in situ*. Verificare l'eventuale presenza di alterazioni patologiche (Fig. 6).
- Asportare il pacchetto viscerale (Fig. 7) recidendo prima l'esofago a livello della sua emergenza in cavità addominale, quindi il retto a livello dell'apertura cloacale. Porre il pacchetto viscerale in una capsula petri in plastica o in una bacinella in plastica di piccole dimensioni e verificare l'eventuale presenza di alterazioni patologiche.
- Isolare fegato, cistifellea e milza dall'apparato gastroenterico e porli in una capsula petri in plastica. Verificare l'eventuale presenza di alterazioni patologiche.

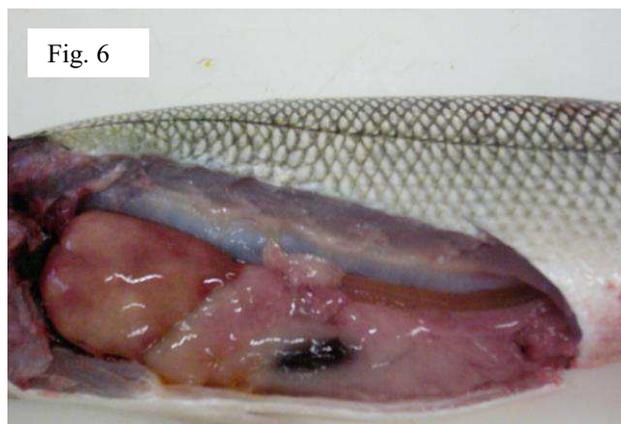


Fig. 6



Fig. 7

- Praticare un taglio longitudinale lungo tutta la lunghezza dello stomaco e dell'intestino (Fig. 8), aprendoli nel senso della loro larghezza, ed osservare la mucosa gastrica ed intestinale verificando l'eventuale presenza di alterazioni patologiche.



Fig. 8

- Nei soggetti che hanno già raggiunto la maturità sessuale osservare le gonadi rimaste *in situ* in cavità addominale (Fig. 9), quindi asportarle mediante recisione con le forbici dei legamenti e dei dotti gonadici e porle in una capsula petri. Verificare l'eventuale presenza di alterazioni patologiche.

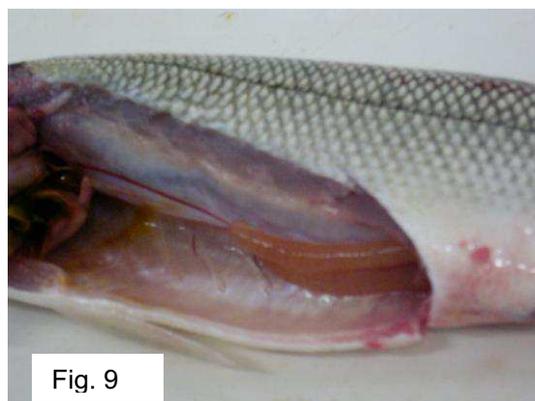


Fig. 9

- Osservare quindi la vescica natatoria rimasta *in situ* in cavità addominale, verificare l'eventuale presenza di alterazioni patologiche, quindi procedere alla sua apertura con le forbici (Fig. 10).



Fig. 10



- Osservare il rene rimasto *in situ* in cavità addominale, verificare l'eventuale presenza di alterazioni patologiche, quindi asportarlo *in toto* quando possibile o parzialmente in caso contrario ed osservarlo allo stereomicroscopio (Fig. 11).
- Aprire con le forbici il sacco pericardico ed esporre il cuore. Osservare il cuore *in situ*, quindi asportarlo con l'ausilio di forbici anatomiche (Fig. 12), porlo in capsula petri ed osservarlo allo stereomicroscopio. Verificare l'eventuale presenza di alterazioni patologiche.



Fig. 11

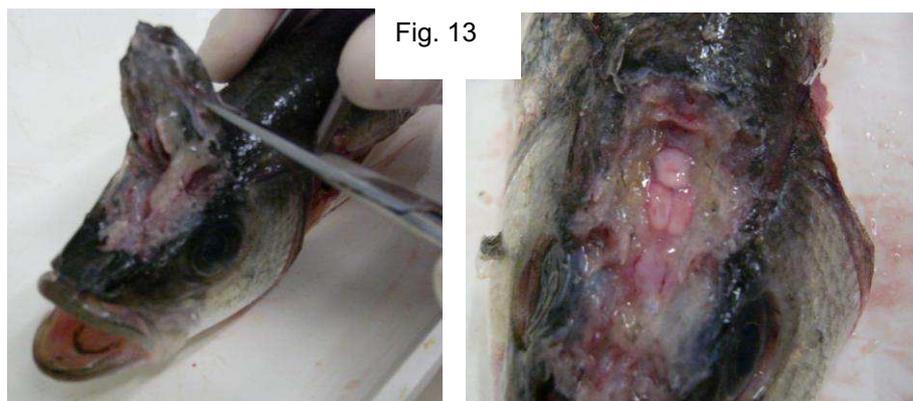


Fig. 12



- Aprire il cranio mediante exeresi trasversale della calotta, osservare l'encefalo *in situ* (Fig. 13), quindi asportarlo con l'ausilio di forbici anatomiche, porlo in capsula petri ed osservarlo allo stereomicroscopio. Verificare l'eventuale presenza d'alterazioni patologiche.
- Praticare infine con lama da bisturi alcune linee di incisione longitudinale della muscolatura laterale, esponendo le zone più profonde. Verificare l'eventuale presenza di alterazioni patologiche.

Nota bene: Qualora il soggetto fosse di dimensioni molto ridotte, è opportuno condurre l'esame necroscopico con l'ausilio dello stereomicroscopio, pur seguendo la procedura descritta nel punto 7.2 del presente Protocollo Operativo.



8. INDICAZIONI PER LA PRESENTAZIONE DEI RISULTATI DI PROVA

Annotare sulla Scheda Esame Necroscopico qualsiasi alterazione patologica rilevata nel corso dell'esame necroscopico.

Le Schede compilate vanno conservate nel raccoglitore apposito del Laboratorio MIPAV ITT.

Sul registro di laboratorio vanno comunque riportati gli estremi per il facile reperimento delle stesse.

9. PRESCRIZIONI DI SICUREZZA

Le procedure descritte nella presente Istruzione Operativa vanno condotte utilizzando mezzi di protezione individuali, quali camici, guanti di gomma o guanti in lattice monouso.

10. PRESCRIZIONI AMBIENTALI

Al termine della prova gli strumenti utilizzati per la conduzione dell'esame necroscopico vanno sottoposti ad ebollizione per circa 10 minuti.

I rifiuti biologici e tutto il materiale contaminato viene trattato come descritto nella SOP MIPAV 09.01.01 "Smaltimento dei rifiuti biologici e gestione del materiale contaminato". Per la pulizia e la disinfezione del Laboratorio di Ittiopatologia sono applicabili le procedure descritte dalla SOP MIPAV BAT 09.01.01, con l'esclusione di quelle previste per l'area ad accesso limitato.

LABORATORIO DI ITTIOPATOLOGIA

ALLEGATO 1 - Scheda Esame Necroscopico

Data.....

N° Registro ITT.....

Informazioni relative al cliente:

Allevamento/committente:	N° Tel./Fax:
Indirizzo/Comune/Provincia:	

Informazioni relative al campione:

Specie ittica:	Età/Taglia:	N° soggetti:
Condizioni del campione: vivo <input type="checkbox"/> morto fresco <input type="checkbox"/> morto poco fresco <input type="checkbox"/> morto non idoneo <input type="checkbox"/>		
Mortalità: no <input type="checkbox"/> sì <input type="checkbox"/> lieve <input type="checkbox"/> moderata <input type="checkbox"/> grave <input type="checkbox"/> dagiorni	Trattamenti: no <input type="checkbox"/> sì <input type="checkbox"/> con.....	
Sintomi:.....		

Tabella di rilevamento delle alterazioni patologiche con indicazione del grado di severità e diffusione:

1=lieve 2=moderata 3=grave

F=focale D=diffusa

Branchie	Cute Pinne	Milza	Fegato	Cistifel.	Lesioni	Rene	Stomaco Intestino	Vescica natat.
					Congestione					
					Anemia					
					Emorragie					
					Erosioni					
					Ulcere					
					Necrosi					
					Noduli					
					↑ Volume					
					↑ Muco					

Note:.....
.....
.....
.....
.....

Data fine esame.....

Firma operatore.....

Protocollo Operativo

CONDUZIONE DELL'ESAME PARASSITOLOGICO

IN SPECIE ITTICHE MARINE

INDICE

- 1. SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE**
- 2. RIFERIMENTI**
- 3. DEFINIZIONI E ABBREVIAZIONI**
- 4. QUALIFICA DEL PERSONALE**
- 5. PARAMETRI AMBIENTALI**
- 6. MATERIALE E APPARECCHIATURE DA UTILIZZARE**
- 7. MODALITA' OPERATIVE**
- 8. INDICAZIONI PER LA PRESENTAZIONE DEI RISULTATI DI PROVA**
- 9. PRESCRIZIONI DI SICUREZZA**
- 10. PRESCRIZIONI AMBIENTALI**

ALLEGATO 1 - Scheda Esame Parassitologico

1. SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE

Il presente Protocollo Operativo ha lo scopo di descrivere le procedure utili ad effettuare la ricerca di parassiti in specie ittiche marine mediante l'osservazione visiva diretta e l'osservazione microscopica di "preparati a fresco" ottenuti da organi e tessuti.

Questa procedura si applica a tutte le specie ittiche marine che vengono sottoposte ad analisi presso il Laboratorio di Prova di Ittiopatologia.

2. RIFERIMENTI

- 2.1 "Fish Disease-Diagnosis and Treatment", Noga E.J., Mosby, St. Louis USA, 1996
- 2.2 "Fish Pathology", 2nd Ed., Roberts R.J., Baillière Tindall, London UK, 1989
- 2.3 "Tecnologia e Patologia in Acquacoltura", Ghittino P., Tipografia Emilio Bono, Torino, 1985
- 2.4 "Fish Diseases. Vol. I", Schaperclaus W., Eds Schaperclaus W, Kulow H., Schreckenbach K. A.A. Balkema, Rotterdam, 1992
- 2.5 "Aquaculture for Veterinarians: fish husbandry and medicine", Brown L., Pergamon Press, Oxford U.K.,
- 2.7 "Protozoan parasites of fishes", Lom J., Dykova I., Elsevier, Amsterdam ND, 1992
- 2.8 "Diseases and disorders of fish in cage culture" Woo P.T.K., Bruno D.W., Lim L.H.S. CABI Publishing, Wallingford UK, 2002
- 2.9 "Marine Fish Parasitology. An Outline" Grabda J., VCH Weinheim, 1991
- 2.10 "Fish Diseases and disorders. Vol. 1. Protozoan and Metazoan Infections" Woo P.T.K., CAB International, Wallingford UK, 1995
- 2.11 "Parasitic Worms of Fish" Williams H., Jones A., Taylor & Francis, London UK, 1994

2.12 RAC BIBLIO ITT VI PIANO

2.13 Protocollo Operativo "Conduzione dell'esame necroscopico in specie ittiche marine"

2.14 SOP MIPAV 09.01.01 "Smaltimento dei rifiuti biologici e gestione del materiale contaminato"

3. DEFINIZIONI E ABBREVIAZIONI

3.1 Specie ittiche marine: tutti i pesci d'acqua salmastra o salata provenienti da allevamento estensivo o intensivo o da acque libere

3.2 Parassita: organismo che vive all'interno (endoparassita) o all'esterno (ectoparassita) di un altro organismo (ospite) causando danni

3.3 Preparato a fresco: preparato ottenuto per raschiamento o schiacciamento diretto di organi e tessuti e/o loro porzioni ed osservato macroscopicamente o microscopicamente senza sottoporlo a tecniche di colorazione

3.4 Scheda Esame Parassitologico: scheda da compilare con tutte le risultanze derivanti dalla conduzione dell'esame parassitologico sul campione in esame (vedi allegato 1)

4. QUALIFICA DEL PERSONALE

Personale docente e tecnico afferente al Laboratorio di Prova di Ittiopatologia, nonché personale non strutturato autorizzato dal Responsabile di Laboratorio di Ittiopatologia e preventivamente addestrato all'esecuzione delle procedure.

5. PARAMETRI AMBIENTALI

N.A.

6. MATERIALI ED APPARECCHIATURE DA UTILIZZARE

6.1 Materiali

Guanti in gomma / guanti in lattice monouso / carta assorbente / forbici in acciaio inox di varie dimensioni / pinze anatomiche e chirurgiche in acciaio inox di varie dimensioni / bacinelle in plastica / lame da bisturi / manico porta lama da bisturi / soluzione fisiologica (8,5‰ NaCl) / aghi da dissezione / *capsule petri* monouso / vetrini portaoggetti / vetrini coprioggetto / siringhe monouso di varia misura / Scheda Esame Parassitologico (vedi allegato 1).

6.2 Apparecchiature

Stereomicroscopio, microscopio ottico con obiettivi a diverso ingrandimento (4x-10x-40x-100x).

7. MODALITÀ PER L'ESECUZIONE DELLA PROVA

7.1 Trattamento del campione:

- Procedere come indicato nel punto 7.1 del Protocollo Operativo "Conduzione dell'esame necroscopico in specie ittiche marine".

7.2 Conduzione dell'esame parassitologico a fresco:

- osservare attentamente la superficie cutanea, le pinne, le fossette nasali (quando ben sviluppate), gli occhi e la cavità buccale e rilevare l'eventuale presenza di parassiti evidenziabili microscopicamente;
- con l'ausilio di un vetrino coprioggetto effettuare un raschiamento gentile del muco cutaneo seguendo la direzione delle squame (Fig. 1). Il raschiamento va condotto in diversi punti della superficie corporea, ed in particolare nella zona del dorso sottostante la pinna dorsale, sui fianchi e nell'area sottostante le pinne pettorali. Nel caso il muco cutaneo asportato si presenti molto compatto, aggiungere con una pipetta in plastica monouso una goccia di soluzione fisiologica. Porre un vetrino coprioggetto al di sopra del materiale schiacciando gentilmente con il dorso di una pinza (Fig. 2) ed osservare dapprima visivamente e quindi al microscopio ottico a diversi ingrandimenti per rilevare l'eventuale presenza di parassiti;



Fig. 1

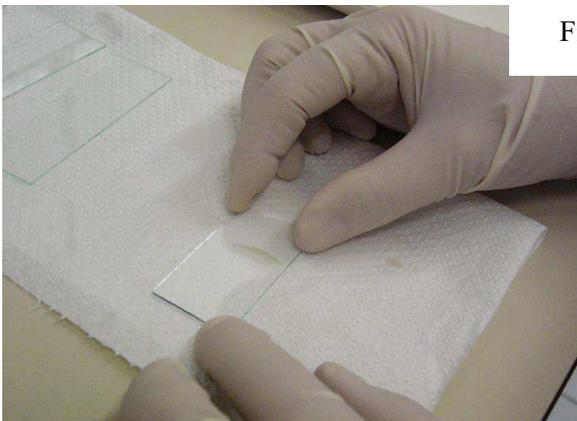


Fig. 2



- ripetere la stessa operazione operando il raschiamento su pinne, opercoli e superficie del cranio (Fig. 3);

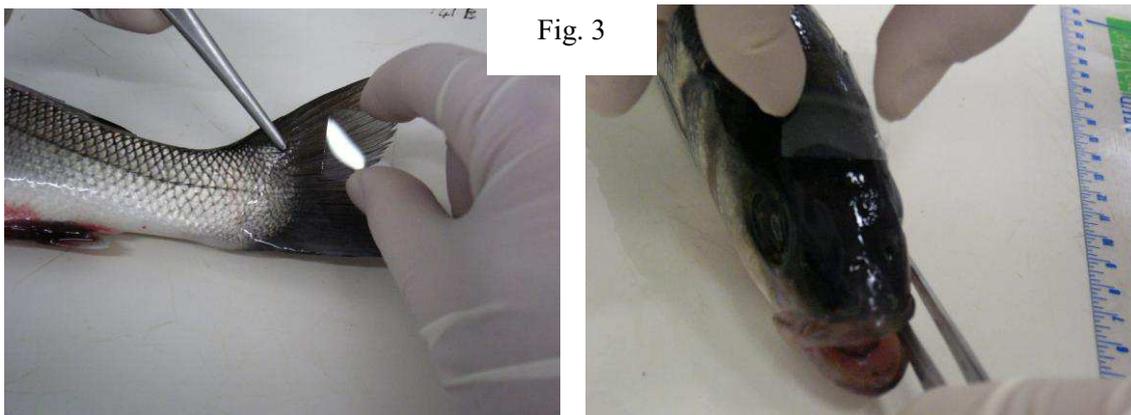


Fig. 3

- asportare gli opercoli seguendo le indicazioni riportate nel punto 7.2 del Protocollo Operativo "Conduzione dell'esame necroscopico in specie ittiche marine", quindi procedere al prelievo di alcuni filamenti branchiali, recidendoli con le forbici da un arco branchiale facendo attenzione a non asportare anche porzioni della struttura ossea di sostegno dell'arco branchiale;
- porre i filamenti branchiali asportati su un vetrino, aggiungere una goccia di soluzione fisiologica, porre un vetrino coprioggetto al di sopra dei filamenti schiacciando gentilmente con il dorso di una pinza (Fig. 4). ed osservare al microscopio ottico a diversi ingrandimenti per rilevare l'eventuale presenza di parassiti;

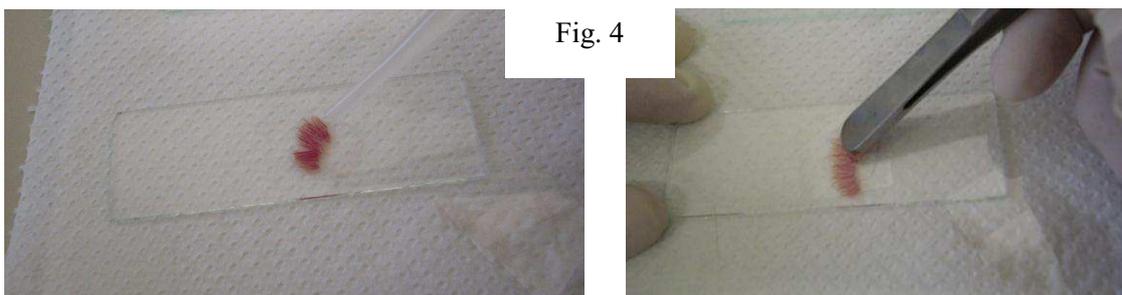


Fig. 4

- procedere all'asportazione degli archi branchiali, come indicato nel punto 7.2 del Protocollo Operativo "Conduzione dell'esame necroscopico in specie ittiche marine", porli in una *capsula petri* monouso (Fig. 5) ed osservarli allo stereomicroscopio rilevando l'eventuale presenza di parassiti individuabili ad un ingrandimento massimo di 50x;
- procedere quindi all'apertura della cavità corporea, seguendo le indicazioni riportate nel punto 7.2 del Protocollo Operativo "Conduzione dell'esame necroscopico in specie ittiche marine". Osservare gli organi così esposti (Fig. 6) al fine di verificare l'eventuale presenza di parassiti evidenziabili macroscopicamente;

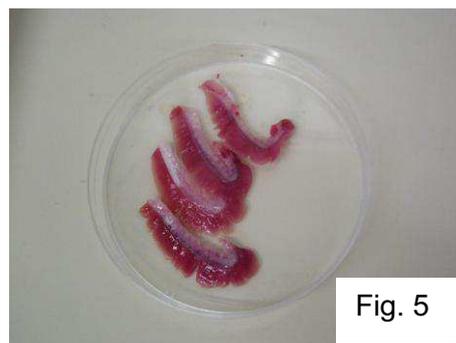


Fig. 5



Fig. 6

- asportare il pacchetto viscerale (Fig. 7) come indicato nel punto 7.2 del Protocollo Operativo "Conduzione dell'esame necroscopico in specie ittiche marine", e porlo in una *capsula petri* monouso o in una bacinella in plastica (a seconda delle dimensioni del soggetto). Osservare gli organi così prelevati per verificare l'eventuale presenza di parassiti evidenziabili macroscopicamente;
- procedere all'isolamento di fegato, milza e cistifellea come descritto nel punto 7.2 del Protocollo Operativo "Conduzione dell'esame necroscopico in specie ittiche marine". Effettuare con l'ausilio delle forbici il prelievo di una piccola porzione di fegato (diametro di circa 1 mm) e porla su un vetrino portaoggetti (Fig. 8). Porre sul frammento d'organo un vetrino coprioggetti ed esercitare una pressione gentile con il dorso di una pinza per rendere il preparato il più sottile possibile. Osservare il preparato al microscopio ottico a diversi ingrandimenti per rilevare l'eventuale presenza di parassiti;

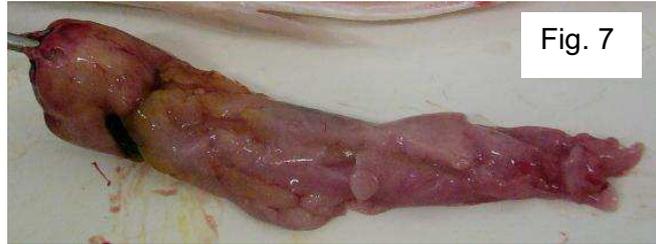


Fig. 7

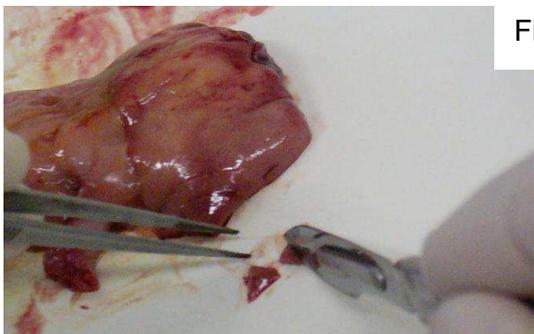


Fig. 8



- effettuare con l'ausilio delle forbici il prelievo di una piccola porzione della milza (diametro di circa 1 mm) (Fig. 10) e porla su un vetrino portaoggetti. Porre sul frammento d'organo un vetrino coprioggetti ed esercitare una pressione gentile con il dorso di una pinza per rendere il preparato il più sottile possibile. Osservare al microscopio ottico a diversi ingrandimenti per rilevare l'eventuale presenza di parassiti;
- prelevare un po' di bile dalla cistifellea con una siringa e porla su un altro vetrino portaoggetti avendo cura di porvi sopra un vetrino coprioggetti (Fig. 11), quindi asportare una piccola porzione della parete e porla su un vetrino schiacciandola sotto un vetrino coprioggetti esercitando una pressione gentile con il dorso di una pinza (Fig. 12). Osservare i due preparati al microscopio ottico a diversi ingrandimenti per rilevare l'eventuale presenza di parassiti;

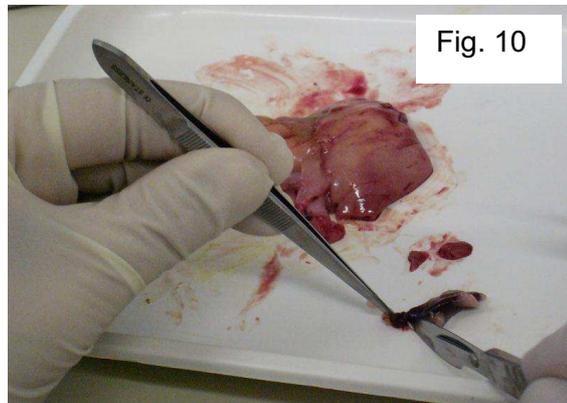


Fig. 10



Fig. 11

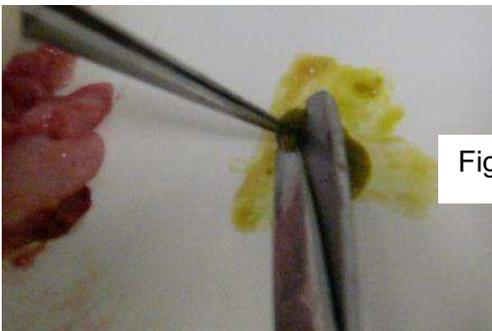
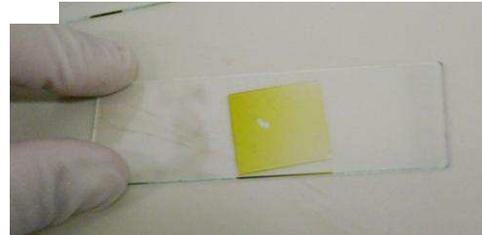
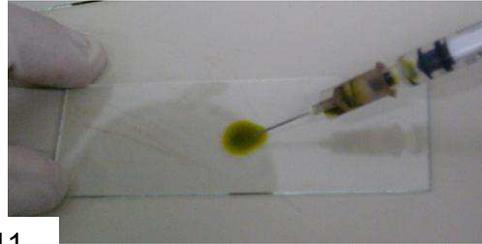
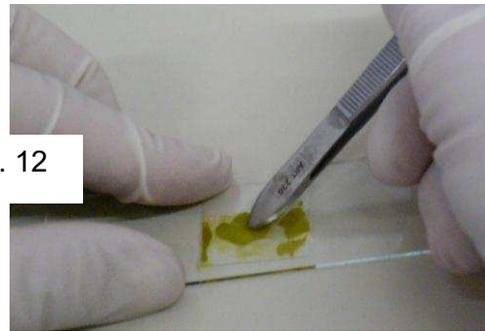


Fig. 12



- procedere all'apertura longitudinale dello stomaco e dell'intestino come descritto nel punto 7.2 del Protocollo Operativo "Conduzione dell'esame necroscopico in specie ittiche marine". Osservare il contenuto gastrico e intestinale per rilevare l'eventuale presenza di parassiti evidenziabili macroscopicamente. Effettuare con un vetrino coprioggetto un raschiamento della mucosa gastrica (Fig. 13) e con un altro vetrino un raschiamento di quella intestinale, quindi porli rispettivamente su due vetrini portaoggetto e coprirli con un vetrino coprioggetto esercitando una pressione gentile con il dorso di una pinza. Osservare i due preparati al microscopio ottico a diversi ingrandimenti per rilevare l'eventuale presenza di parassiti;
- procedere al prelievo di una piccola porzione di parete dell'intestino (diametro di circa 2-3 mm), raschiarne gentilmente la superficie interna e porla su un vetrino portaoggetto coprendola poi con un vetrino coprioggetto (Fig. 14). Esercitare una pressione gentile con il dorso di una pinza ed osservare il preparato al microscopio ottico a diversi ingrandimenti per rilevare l'eventuale presenza di parassiti;

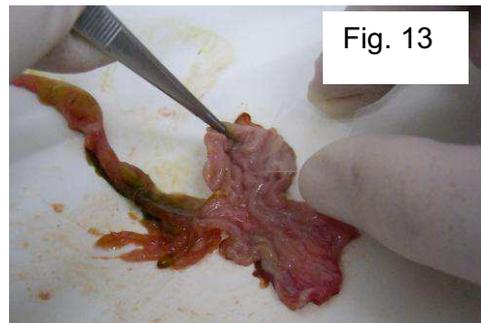


Fig. 13



Fig. 14



- procedere quindi all'osservazione visiva delle gonadi rimaste *in situ* in cavità addominale (nei soggetti che stiano raggiungendo o abbiano raggiunto la maturità sessuale) (Fig. 15) quindi procedere alla loro asportazione come indicato nel punto 7.2 del Protocollo Operativo "Conduzione dell'esame necroscopico in specie ittiche marine". Prelevare un piccolo frammento del tessuto gonadico (diametro di 1 mm) e porla su un vetrino portaoggetto coprendola quindi con un vetrino coprioggetto. Esercitare una pressione gentile con il dorso di una pinza ed osservare il preparato al microscopio ottico a diversi ingrandimenti per rilevare l'eventuale presenza di parassiti. Prelevare quando possibile anche una piccola porzione del dotto gonadico e porla su un vetrino portaoggetto, coprendola con un vetrino coprioggetto e osservando poi il preparato al microscopio ottico a diversi ingrandimenti per rilevare l'eventuale presenza di parassiti;

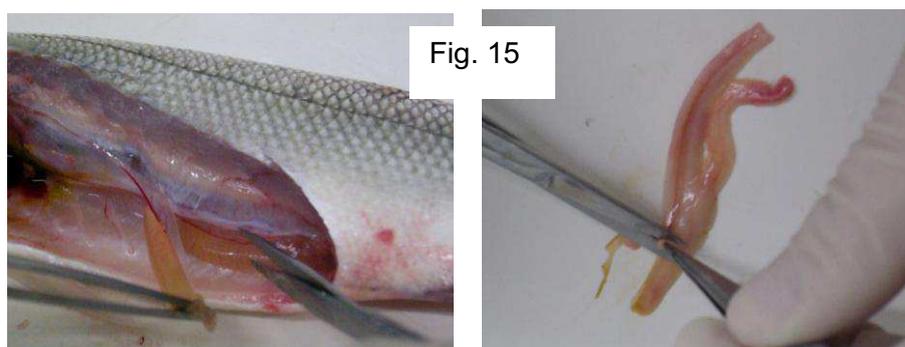


Fig. 15

- osservare la vescica natatoria rimasta *in situ* rilevando l'eventuale presenza di parassiti evidenziabili macroscopicamente. Procedere quindi alla sua asportazione come indicato nel punto 7.2 del Protocollo Operativo "Conduzione dell'esame necroscopico in specie ittiche marine". Aprire la vescica natatoria effettuando con le forbici un occhiello nella parete e procedendo nel taglio per tutta la sua lunghezza (quando le dimensioni dell'organo lo consentono). Effettuare con un coprioggetto un raschiamento della parete interna della vescica natatoria, quindi porre il vetrino coprioggetto su un vetrino portaoggetto ed osservare il preparato al microscopio ottico a diversi ingrandimenti per rilevare l'eventuale presenza di parassiti;
- osservare il rene rimasto *in situ* in cavità addominale, quindi procedere all'asportazione con lama da bisturi di una piccola porzione (diametro di 1 mm) dell'organo. Porla su un vetrino portaoggetto coprendola quindi con un vetrino coprioggetto ed esercitare una pressione gentile con il dorso di una pinza (Fig. 16). Osservare il preparato al microscopio ottico a diversi ingrandimenti per rilevare l'eventuale presenza di parassiti;

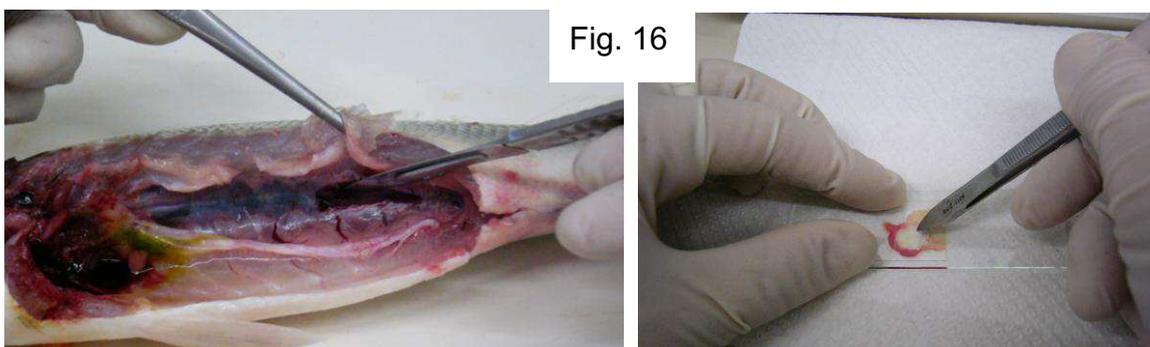


Fig. 16

- aprire con le forbici il sacco pericardico ed osservare il cuore *in situ*, quindi procedere alla sua asportazione recidendo con le forbici il bulbo arterioso. Aprire con le forbici o il bisturi la cavità cardiaca ed il bulbo arterioso (Fig. 17), rilevando visivamente l'eventuale presenza di parassiti evidenziabili macroscopicamente, quindi prelevare con un vetrino coprioggetto una goccia del sangue contenuto, porlo su un vetrino portaoggetto ed osservare il preparato al microscopio ottico a diversi ingrandimenti per rilevare l'eventuale presenza di parassiti;

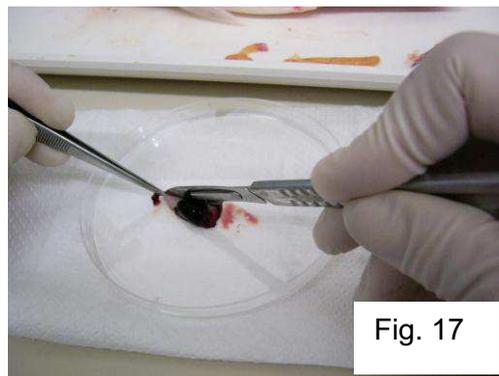


Fig. 17

- procedere all'asportazione dell'occhio mediante dissezione dei tessuti lassi circostanti (Fig. 18) e recisione del nervo ottico. Porre l'organo in una capsula petri monouso, sezionarlo con una lama da bisturi e procedere al prelievo dell'umor vitreo contenuto nella cavità oculare con l'ausilio di un vetrino coprioggetto. Porlo su un vetrino portaoggetto ed osservare il preparato al microscopio ottico a diversi ingrandimenti per rilevare l'eventuale presenza di parassiti. Estrarre con un paio di pinze il cristallino e porlo su un vetrino portaoggetto, quindi procedere alla sua osservazione allo stereomicroscopio per rilevare l'eventuale presenza di parassiti;
- aprire la calotta cranica ed estrarre il cervello come indicato nel punto 7.2 del Protocollo Operativo "Conduzione dell'esame necroscopico in specie ittiche marine". Prelevare un piccolo frammento del cervello (diametro di 1 mm) e porlo su un vetrino portaoggetto coprendolo quindi con un vetrino coprioggetto. Esercitare una pressione gentile con il dorso di una pinza ed osservare il preparato al microscopio ottico a diversi ingrandimenti per rilevare l'eventuale presenza di parassiti;
- procedere alla dissezione del tessuto muscolare come indicato nel punto 7.2 del Protocollo Operativo "Conduzione dell'esame necroscopico in specie ittiche marine" osservando l'eventuale presenza di parassiti evidenziabili macroscopicamente. Prelevare con lama da bisturi piccole porzioni di tessuto muscolare (diametro di 0,5-1 mm) e porle su vetrino portaoggetto. Coprirle con vetrino coprioggetto ed operare uno schiacciamento gentile apponendo un vetrino portaoggetti che viene poi tolto prima dell'osservazione microscopica. Osservare il preparato al microscopio ottico a diversi ingrandimenti per rilevare l'eventuale presenza di parassiti.

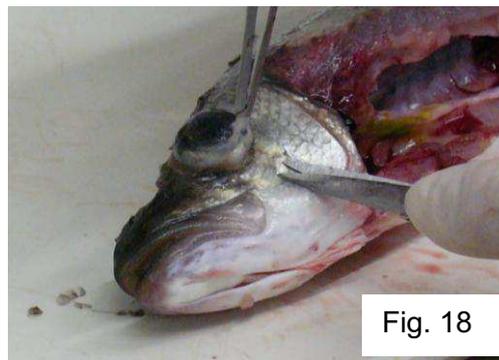


Fig. 18

Nota bene 1: Nel caso i soggetti da sottoporre all'esame necroscopico siano di dimensione troppo ridotte per poter operare la corretta dissezione di alcuni organi (ad esempio l'apparato gastroenterico), si può procedere all'osservazione microscopica dell'organo *in toto* o di una parte di esso previo schiacciamento diretto sotto vetrino coprioggetto.

Nota bene 2: L'identificazione dei parassiti riscontrati nel corso dell'esame parassitologico a fresco viene condotta seguendo le procedure che vengono illustrate nei lavori specifici archiviati nei RAC BIBLIO ITT VI PIANO e nei volumi di tassonomia presenti nello scaffale interno al Laboratorio di Prova di Ittiopatologia.

Nota bene 3: Qualora per l'identificazione dei parassiti reperiti risultasse necessario ottenere preparati fissati, chiarificati o colorati o sottoporre i parassiti ad analisi molecolare, si farà riferimento a procedure specifiche riportate nei testi di tassonomia o nei lavori scientifici specifici. A scopo indicativo le tecniche di identificazione utilizzate di base nel corso della ricerca vengono illustrate nel Protocollo Operativo "Tecniche di identificazione di parassiti di pesci marini" e nel Protocollo Operativo "Tecniche di identificazione molecolare di Myxozoa parassiti di pesci marini".

8. INDICAZIONI PER LA PRESENTAZIONE DEI RISULTATI DI PROVA

Annotare sulla Scheda Esame Parassitologico (vedi Allegato 1) la presenza di qualsiasi agente parassitario rilevata nel corso dell'esame parassitologico a fresco.

Le Schede compilate vanno conservate nel raccoglitore specifico depositato presso il Laboratorio MIPAV ITT unitamente ad osservazioni particolari ed alla messa a punto di tecniche o procedure inerenti la ricerca.

9. PRESCRIZIONI DI SICUREZZA

Le procedure descritte nel presente Protocollo Operativo vanno condotte utilizzando mezzi di protezione individuali, quali camici, guanti di gomma o guanti in lattice monouso.

10. PRESCRIZIONI AMBIENTALI

Al termine della prova gli strumenti utilizzati per la conduzione dell'esame parassitologico vanno sottoposti ad ebollizione per circa 10 minuti o a sterilizzazione in stufa o autoclave. I rifiuti biologici e tutto il materiale contaminato viene trattato come descritto nella SOP MIPAV 09.01.01 "Smaltimento dei rifiuti biologici e gestione del materiale contaminato".

LABORATORIO DI ITTIOPATOLOGIA

ALLEGATO 2 - Scheda Esame Parassitologico

Data.....

N° Registro ITT.....

Informazioni relative al cliente:

Allevamento/committente:	N° Tel./Fax:
--------------------------	--------------

Informazioni relative al campione:

Specie ittica:	Età/Taglia:	N° soggetti:
Condizioni del campione: vivo <input type="checkbox"/> morto fresco <input type="checkbox"/> morto poco fresco <input type="checkbox"/> morto non idoneo <input type="checkbox"/> congelato <input type="checkbox"/> fissato in formalina <input type="checkbox"/> fissato in alcool <input type="checkbox"/>		
Mortalità: no <input type="checkbox"/> sì <input type="checkbox"/> lieve <input type="checkbox"/> moderata <input type="checkbox"/> grave <input type="checkbox"/> dagiorni	Trattamenti: no <input type="checkbox"/> sì <input type="checkbox"/> con.....	
Sintomi:.....		

Tabella di rilevamento della presenza di parassiti con indicazione dell'intensità di infestazione

B=bassa intensità M=media intensità A=alta intensità

Organo	Parassiti	Intensità	Note
Branchie			
Cute/Pinne			
Bocca			
Milza			
Fegato			
Rene			
Stomaco			
Intestino			
Vescica natatoria			
Vescica biliare			
Muscolo			
Occhio			
Cervello			
Cuore			
Gonadi			
Altro			

Data fine esame.....

Firma operatore.....

Protocollo Operativo Standard

PROTOCOLLO PER LA PROCESSAZIONE DEI CAMPIONI DI TESSUTO PER PREPARATI ISTOLOGICI

INDICE

- 1. SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE**
- 2. RIFERIMENTI**
- 3. DEFINIZIONI E ABBREVIAZIONI**
- 4. QUALIFICA DEL PERSONALE**
- 5. PARAMETRI AMBIENTALI**
- 6. MATERIALI ED APPARECCHIATURE DA UTILIZZARE**
- 7. MODALITA' OPERATIVE**
- 8. INDICAZIONI PER LA PRESENTAZIONE DEI RISULTATI (DI PROVA)**
- 9. PRESCRIZIONI DI SICUREZZA**
- 10. PRESCRIZIONI AMBIENTALI**

ALLEGATO 1: Modulo di Invio dei campioni al Laboratorio di Istopatologia

1. SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE

Lo scopo del presente protocollo operativo è quello di definire le procedure adottate per la processazione del campione sottoposto all'esame istopatologico, attraverso la disidratazione, diafanizzazione, impregnazione ed inclusione in paraffina, cui seguono le operazioni di taglio e di colorazione istologica specifica.

La presente procedura è effettuata su campioni di tessuto precedentemente fissati in formalina tamponata al 10%.

2. RIFERIMENTI

2.1 SOP MIPAV/ITT 10.02.01 "Gestione del campione presso il laboratorio di prova di ittiopatologia"

2.2 SOP MIPAV/IST 11.01.01 "Protocollo per le operazioni di taratura del processatore di tessuti"

2.3 SOP FT 09.01.01 " Smaltimento dei rifiuti di laboratorio di tipo chimico classificati come pericolosi prodotti nel servizio di prova di farmacologia"

2.4 SOP MIPAV/IST 10.01.01 " Protocollo per la processazione di campioni di tessuto per preparati istologici".

2.5 SOP MIPAV/IST 10.01.02 "Protocollo per l'inclusione in paraffina di campioni istologici".

2.6 SOP MIPAV/IST 10.01.03 "Protocollo per il taglio di sezioni istologiche incluse in paraffina".

2.7 SOP MIPAV/IST 10.01.04 "Protocollo per la colorazione delle sezioni istologiche con ematossilina-eosina".

2.8 "Trattato di Istologia", W. Bloom and D.W. Fawcett, Piccin, Padova, 1970.

2.9 "Manuale di tecniche istologiche ed istochimiche", V. Mazzi, Piccin, Padova, 1977.

2.10 “Color Atlas of Fish Histopathology”, S.S. Kubota, T. Miyazaki, A Egusa, Shin-Suisan Shinbun-Sha Ltd., Japan, 1981.

3. DEFINIZIONI E ABBREVIAZIONI

3.1 Processatore: TISSUE TEK II mod. 4634 processore per istologia che opera una disidratazione dei campioni, mediante una serie di passaggi in alcool a concentrazioni diverse; una diafanizzazione mediante due passaggi in xilolo; un'impregnazione in paraffina mediante due passaggi in contenitori termici dove la paraffina dallo stato solido passa allo stato fluido (il punto di fusione della paraffina è compreso tra i 55°C e i 61°C).

3.2 Paraffina: mezzo di inclusione usato

3.3 Campione: organi o parti di organi prelevati durante necropsia e sottoposti a tutta la serie di procedure per ottenere un preparato istologico finale.

3.4 Centralina: gruppo di tre macchinari (Thermal Unit, Dispenser Unit, Cool Unit)

3.5 Lama: lama del microtomo

3.6 Modulo di invio dei campioni al Laboratorio di Istopatologia aviare ed ittica: Modulo da utilizzare per ogni campione del Laboratorio di Prova di Ittiopatologia che viene sottoposto ad esame istologico sia quale accompagnamento identificativo sia quale scheda dove annotare la lettura dei preparati istologici.

4. QUALIFICA DEL PERSONALE

La procedura operativa della presente SOP è eseguibile da personale strutturato e non, opportunamente addestrato ed autorizzato dal responsabile di laboratorio di prova MIPAV/IST.

5. PARAMETRI AMBIENTALI

La parte della procedura che identifichiamo come “IMPREGNAZIONE” va condotta in camera termostata e tarata a 58°C±3°C, mentre le altre operazioni della prima fase della procedura sono condotte a temperatura ambiente e sotto cappa chimica in funzione.

6. MATERIALI ED APPARECCHIATURE DA UTILIZZARE

Apparecchiature

Processore TISSUE TEK II mod. 4634 / Unità termica per la fusione della paraffina “THERMAL UNIT TBS 88.600” / Dispensatore di paraffina “DISPENSER UNIT TBS 88.200” / Piastra di raffreddamento per la solidificazione della paraffina / Microtomo mod. 1130 BIOCUT / Bagno termostato con temperatura regolabile da 20°C a 50°C / Microscopio ottico

Materiali

Alcool assoluto / Alcool Etilico 100°, 96° e 80° / Xylene / Xilolo / Paraffina / Acqua distillata / Soluzione di ematossilina secondo Carazzi / Montante EUKITT / Gabbiette per processo / Matita / Contenitore a bocca larga / Pinzette / Lame da microtomo monouso / Vetrini portaoggetto molati con banda sabbiata / Vetrini coprioggetto / Lametta con un solo filo tagliente / Pennelli piccoli (N° 1) / Vassoi in acciaio a base calibrata per l'asciugatura in stufa dei vetrini / Stufa / Vaschette per deparaffinare / Cestelli portavetrini / Coloratore manuale / Carta bibula.

7. MODALITA' OPERATIVE

7.1 Fissare i campioni di tessuto od organo che si ritiene debbano essere sottoposti all'esame istopatologico in formalina tamponata al 10%, accertandosi di effettuare l'operazione sotto cappa chimica preventivamente accesa. Gli organi di piccole dimensioni vengono fissati *in toto*. Il campione deve permanere nel fissativo per almeno 24 ore prima di essere processato.

7.2 L'invio del campione presso il Laboratorio di Istopatologia viene corredato di una scheda d'accompagnamento debitamente compilata come da SOP MIPAV/ITT 10.02.01

7.3 La conduzione dell'esame istologico sui campioni fissati seguirà le procedure descritte in SOP MIPAV/IST 10.01.01 " Protocollo per la processazione di campioni di tessuto per preparati istologici", SOP MIPAV/IST 10.01.02 "Protocollo per l'inclusione in paraffina di campioni istologici", SOP MIPAV/IST 10.01.03 "Protocollo per il taglio di sezioni istologiche incluse in paraffina". Per quanto concerne la colorazione delle sezioni ottenute, si farà riferimento alla SOP MIPAV/IST 10.01.04 "Protocollo per la colorazione delle sezioni istologiche con ematossilina-eosina" e ad altre colorazioni istologiche come da manuale e da lavori scientifici specifici.

7.4 Le sezioni istologiche verranno sottoposte ad osservazione microscopica da parte di personale esperto ed autorizzato al fine di rilevare l'eventuale presenza di agenti patogeni e le correlate alterazioni patologiche.

8. INDICAZIONI PER LA PRESENTAZIONE DEI RISULTATI

Qualsiasi osservazione condotta nel corso dell'esame istopatologico va annotata sulla Scheda "Modulo di Invio dei campioni al Laboratorio di Istopatologia Aviare ed Ittica", conservata nel raccoglitore RAC IST "Moduli di Invio dei campioni al Laboratorio di Istopatologia Aviare ed Ittica", e quando ritenuto opportuno, sul Quaderno di Laboratorio inerente la ricerca (MIPAV ITT 0005).

Sul registro di laboratorio di Prova di Ittiopatologia vanno sempre riportati gli estremi per il facile reperimento delle stesse, come da SOP MIPAV ITT 10.02.01.

9. PRESCRIZIONI DI SICUREZZA

9.1 Seguire tutte le prescrizioni di sicurezza riportate nelle SOP MIPAV/IST 10.01.01 " Protocollo per la processazione di campioni di tessuto per preparati istologici", SOP MIPAV/IST 10.01.02 "Protocollo per l'inclusione in paraffina di campioni istologici", SOP MIPAV/IST 10.01.03 "Protocollo per il taglio di sezioni istologiche incluse in paraffina" e SOP MIPAV/IST 10.01.04 "Protocollo per la colorazione delle sezioni istologiche con ematossilina-eosina".

9.2 Le procedure descritte nel presente Protocollo Operativo vanno comunque condotte utilizzando mezzi di protezione individuali, quali camici, guanti di gomma o guanti in lattice monouso e utilizzando sostanze volatili tossiche sotto cappa chimica in funzione.

10. PRESCRIZIONI AMBIENTALI

Seguire tutte le prescrizioni ambientali riportate nelle SOP MIPAV/IST utilizzate per questa procedura, la SOP FT 09.01.01 " Smaltimento dei rifiuti di laboratorio di tipo chimico classificati come pericolosi prodotti nel servizio di prova di farmacologia" e SOP MIPAV 09.01.01 "Smaltimento dei rifiuti biologici e gestione del materiale contaminato".

