

Atti del
XXII Convegno Nazionale S.I.P.I.
Società Italiana Patologia Ittica

8-9 SETTEMBRE 2016

Fondazione Edmund Mach
SAN MICHELE ALL'ADIGE (TN)



Con la collaborazione di:



Comitato organizzatore:

*Erica CANDIOLI
Manuela DALLA POZZA
Fernando LUNELLI
Amedeo MANFRIN
Anna TOFFAN*

Comitato scientifico:

*Paola BERALDO
Manuela DALLA POZZA
Andrea FABRIS
Maria Letizia FIORAVANTI
Andrea GUSTINELLI
Amedeo MANFRIN
Fabio MARINO
Giuseppe MATTIUZZI
Marino PREARO
Francesco QUAGLIO
Anna TOFFAN*

Segreteria:

*Manuela DALLA POZZA
Amedeo MANFRIN
Alessandra SILVAGNI*

PROGRAMMA

Giovedì 8 settembre

- 09.00-10.00 Registrazione dei partecipanti
- 10.00-10.30 Saluto del Presidente S.I.P.I. Dr. Marino Prearo
- Saluto del responsabile del Dipartimento Filiere Agroalimentari -
Centro Trasferimento Tecnologico della Fondazione E. Mach - Dr.
Michele Pontalti
- Saluto del Presidente A.P.I. Dr. Pierantonio Salvador
- 10.30-13.00 **Comunicazioni scientifiche - I sessione**
- Moderatore: Dr. Amedeo Manfrin
Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie
- 10.30-10.45 **ISOLAMENTO E CARATTERIZZAZIONE DI RHABDOVIRUS DA UN GRAVE EPISODIO DI MORTALITA' IN PESCE GATTO - O1**
Bedendo G. *, Fortin A., Buratin A., Quartesan R., Pretto T., Pascoli F., Toffan A.
- 10.45-11.00 **ENCEFALO-RETINOPATIA VIRALE IN ORATA CAUSATA DA CEPPI RIASSORTANTI DI BETANODAVIRUS - O2**
Toffan A.*, Pascoli F., Panzarin V., Abbadi M., Quartesan R., Buratin A., Pretto T., Padros F.
- 11.00-11.15 **ENCEFALO-RETINOPATIA VIRALE IN SPIGOLA DICENTRARCHUS LABRAX: NUOVE STRATEGIE DI IMMUNIZZAZIONE - O3**
Pascoli F.*, Nuñez-Ortiz N., Buonocore F., Stocchi V., Picchietti S., Stratmann A., Scapigliati G., Toffan A.
- 11.15-11.45 **Coffee break**
- 11.45-12.00 **INFEZIONE DA BETANODAVIRUS: INDAGINE SUL RUOLO DELLA VONGOLA FILIPPINA (RUDITAPES PHILIPPINARUM) - O4**
Volpe E.*, Pagnini N., Serratore P., Ciulli S.

- 12.00-12.15 **OSTREID HERPESVIRUS TIPO 1 E *VIBRIO AESTUARIANUS*: STUDIO DI DUE IMPORTANTI PATOGENI DELL'OSTRICA CONCAVA NEL CONTESTO ITALIANO - O5**
Burioli E.A.V.*, Houssin M., Bona M.C., Fioravanti M.L., Riina M.V., Prearo M.
- 12.15-12.30 **STURGEON IRIDOVIRUS: DAL FOCOLAIO ALLA DIAGNOSI DI LABORATORIO - O6**
Caruso C., Pedron C., Prato R.*, Toffan A., Bigarré L., Pastorino P., Burioli E.A.V., Righetti M., Foglini C., Masoero L., Prearo M.
- 12.30-12.45 **INDAGINE EZIOLOGICA IN FOCOLAI DI MORTALITÀ IN STORIONE RUSSO (*ACIPENSER GUELLENSTAEDTII*) E STORIONE SIBERIANO (*ACIPENSER BAERII*) - O7**
Volpe E., Sirri R., Passalacqua P.L., Cesa Bianchi F., Serratore P., Mandrioli L., Ciulli S.*
- 12.45-13.00 **INDAGINE SULLA PATOGENICITÀ DI CEPPI MOBILI DI *AEROMONAS* SPP. ISOLATI DA SPECIE ITTICHE - O8**
Borella L.*, Moretti V.M., Alborali G.L., Scali F., Salogni C.
- 13.00-14.30 **Light lunch e visita (opzionale) al Centro Ittico Sperimentale FEM**
- 14.30-16.00 **Comunicazioni scientifiche - II sessione**
- Moderatore Dr.^{ssa} Sara Ciulli
Dipartimento Scienze Mediche Veterinarie - Università di Bologna
- 14.30-14.45 **SVILUPPO DI UNA MULTILOCUS SEQUENCE ANALYSIS PER L'IDENTIFICAZIONE DEI *VIBRIO* APPARTENENTI AL CLADE SPLENDIDUS E APPLICAZIONE DELLA METODICA DURANTE UN EVENTO DI MORTALITÀ IN MOLLUSCHI - O9**
Burioli E.A.V.*, Oden E., Trancart S., Prearo M., Houssin M.
- 14.45-15.00 **CERTEZZE, MANCANZE E PROSPETTIVE FUTURE SU *AMYLODINIUM OCELLATUM* - O10**
Massimo M.*, Beraldo P., Bulfon C., Volpatti D., Galeotti M.
- 15.00-15.15 **INDAGINE SUL POSSIBILE IMPATTO DELLA MALATTIA PROLIFERATIVA RENALE (MPR) SULLE POPOLAZIONI DI SALMONIDI DELL'ALTO ADIGE - O11**
Gustinelli A.*, Caffara M., Menconi V., Grund H., Merlo N., Pircher A., Quaglio F., Fioravanti M.L.

- 15.15-15.30 **FAUNA PARASSITARIA DEGLI STADI GIOVANILI DI ANGUILLA ANGUILLA LINNAEUS, 1758 IN UN FIUME DELLA SARDEGNA NORD OCCIDENTALE (ALGHERO) - O12**
Culurgioni J.*, Diciotti R., Chessa G., Fois N.
- 15.30-15.45 **PRIMA SEGNALAZIONE DI PSEUDEMPLEUROSOMA SP. NELL'ESOFAGO DI TRIGLIE DI FANGO (MULLUS BARBATUS BARBATUS) E DI SCOGLIO (MULLUS SURMULETUS) DEL MAR MEDITERRANEO - O13**
Cipriano A. *, Caffara M., Bottari T., Gaglio G., Lanteri G., Marino F.
- 15.45-16.00 **IMPORTAZIONE DI PESCI ORNAMENTALI D'ACQUA DOLCE: RISCHIO D'INTRODUZIONE DI PATOGENI? - O14**
Bona M.C.*, Righetti M., Burioli E.A.V., Barisone S., Dellerba D., Maurella C., Scanzio T., Ru G., Prearo M.
- 16.00-16.30 **Coffee break**
- 16.30-17.30 **Comunicazioni scientifiche - III sessione**
- Moderatore Dr.^{ssa} Gabriella Gaglio
Dipartimento di Scienze Veterinarie -Università di Messina
- 16.30-16.45 **UTILIZZO DI DOCTOR FISH NEI CENTRI ESTETICI: PRIME VALUTAZIONI SU LINEE GUIDA NEL RISPETTO DEL WELFARE E DELLA SANITA' PUBBLICA - O15**
Prearo M., Righetti M.*, Bona M.C., Pastorino P., Foglini C., Briata M.P., Ru G., Pennazio R.
- 16.45-17.00 **IL FENOMENO DELLA COSÌ DETTA SPINA BIFIDA NEL TONNETTO ALLETTERATO (*E. alletteratus*, *Rafinesque 1810*). UN MITO SFATATO - O16**
De Benedetto G.*, Marino F., Macrì F., Salvo A., Puleio R., Bellantone F., Arcangeli G.
- 17.00-17.15 **VALUTAZIONE DELLA EVENTUALE TOSSICITA' IN VIVO DI NANOPARTICELLE DI ARGENTO IN ESEMPLARI ADULTI DI DANIO RERIO - O17**
Capparucci F.*, Di Caro G., Marino F., Brundo M.V. , Salvo A., Rotondo A., Macri B., Pecoraro R., D'Amante G., Zimbone M.
- 17.15-17.30 **LE MORTALITA' ANOMALE DI ITTIOFAUNA: UN SERIO PROBLEMA DA AFFRONTARE CON RIGORE - O18**
Pastorino P.*, Bona M.C., Foglini C., Burioli E.A.V., Scanzio T., Marra A., Maurella C., Desiato R., Ru G., Prearo M.

17.30-19.00 **Assemblea dei soci**

20.30 **Cena sociale "da Pino", Loc. Grumo - S. Michele all'Adige (TN)**

Venerdì 9 settembre

9.00-11.00 **Comunicazioni scientifiche - IV sessione**

Moderatore Dr. Marino Prearo

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

9.00-9.20 **ANALISI DEI FATTORI DI RISCHIO DI INTRODUZIONE DELLA SEV NEGLI ALLEVAMENTI DI TROTE DELLA PROVINCIA AUTONOMA DI TRENTO - O19**

Ceolin C.*, Toson M., Bille L., Toffan A., Quartesan R., Casarotto C., Bortolotti L., Gatti F., Piacini A., Dalla Pozza M.

9.20-9.40 **PROPOSTA DI METODI ALTERNATIVI DI ERADICAZIONE DI SEV E NEI NELLA PROVINCIA AUTONOMA DI TRENTO - O20**

Gatti F.*, Bortolotti L., Piacini A., Bille L., Manfrin A., Dalla Pozza M., Fasoli F.

9.40-10.00 **RESISTENZA DEL CARPIONE (*SALMO CARPIO*) AL VIRUS DELLA NECROSI EMATOPOIETICA INFETTIVA IN PROVE DI COABITAZIONE CON TROTE IRIDEE (*ONCORHYNCHUS MYKISS*) CLINICAMENTE INFETTE - O21**

Manfrin A.* , Toffan A., Quartesan R., Fiocchi E., Bortolotti L., Gatti F., Piacini A., Lunelli F.

10.00-10.20 **VALUTAZIONE DEI RISCHI SANITARI CHE SI POSSONO INCORRERE DURANTE OPERAZIONI DI IMMISSIONE DI FAUNA ITTICA IN ACQUE PUBBLICHE - O22**

Prearo M.*, Pastorino P., Foglini C., Maurella C., Righetti M., Burioli E.A.V., Bona M.C., Ru G.

- 10.20-10.40 **SEMINE DI SPECIE ITTICHE IN ACQUE PUBBLICHE: ASPETTI SANITARI E PROBLEMATICHE APERTE - O23**
Salvador P.A., Fabris A.*, Prearo M., Maroni Ponti A., Dalla Pozza M., Manfrin A.
- 10.40-11.00 Discussione
- 11.00-11.30 **Coffee break**
- 11.30-12.00 **Presentazione nuovi progetti AGER**
- Moderatore Dr Andrea Fabris
Associazione Piscicoltori Italiani
- 11.30-11.45 **FINE FOOD FOR FISH (4F) - LA RICERCA AL FIANCO DELL'ACQUACOLTURA NAZIONALE - O24**
Saroglia M., Gasco L., Prearo M.*, Terova G., Pulina P., Uzzau S., Labra M., Mariani P., Lorenzetti R., Anedda R., Hardy R., Zoccarato I.
- 11.45-12.00 **NUOVI INGREDIENTI E SOTTOPRODOTTI PER MIGLIORARE SOSTENIBILITÀ, PRODUTTIVITÀ, BENESSERE, QUALITÀ E SICUREZZA ALIMENTARE DELLE SPECIE ITTICHE ALLEVATE - O25**
Tibaldi E.*, Aleandri R., Lunelli F., Marino G., Olivotto I., Parisi G., Pomilio F., Volpatti D.
- 12.00-13.00 **Premiazioni SIPI**
- 13.00-14.30 **Light lunch e visita (opzionale) al Centro Ittico Sperimentale FEM**

POSTER PRESENTATI:

- 1- **STUDIO DELLA FAUNA PARASSITARIA IN GATTUCCI (*SCYLIORHINUS CANICULA*) PROVENIENTI DA CAMPAGNE SPERIMENTALI DI PESCA A STRASCICO**
Gangemi J., Gaglio G., Napoli E., Rinelli P., Giorgianni P., Marino F.
- 2- **BATTERI DELLA FAMIGLIA MIDICHLORIACEAE (ORDINE RICKETTSIALES): POSSIBILI PATOGENI EMERGENTI PER I VERTEBRATI?**
Cafiso A., Serra V., Petroni G., Comandatore F., Bazzocchi C.

- 3 - **RISULTATI PRELIMINARI SULLA RISPOSTA ANTIOSSIDANTE IN ORGANI DI MUGGINI (*LIZA RAMADA*) PROVENIENTI DA DUE STAGNI DELLA SARDEGNA OCCIDENTALE**
Antuofermo E., Caldaroni B., Magara G., Scanzio T., Pais A., Ariu R., Polinas M., Scoparo M., Righetti M., Dörr A.J.M., Elia A.C., Prearo M.
- 4 - **UTILIZZO DELLO SPETTROMETRO DI MASSA MALDI-TOF PER L'IDENTIFICAZIONE DI GERMI AMBIENTALI PROVENIENTI DA ACQUE DI TRASPORTO DI PESCI ORNAMENTALI D'IMPORTAZIONE**
Adriano D., Righetti M., Lai J., Previto G., Dellerba D., Foglini C., Corvonato R., Zanoni R.G., Decastelli L., Prearo M.
- 5 - **PROVE DI TOSSICITA' IN VITRO SU MONOSTRATI CELLULARI DI PROVENIENZA ITTICA: L'ARSENICO INORGANICO**
Arsieni P., Prato R., Brizio P., Caruso C., Righetti M., Elia A.C., Squadrone S., Abete M.C., Masoero L., Prearo M.
- 6 - **CASO DI MORTALITA' IN TROTE IRIDEE DA IDROCARBURI POLICICLICI AROMATICI (IPA) IN UN AMBIENTE DESTINATO AD USO ALIEUTICO**
Foglini C., Squadrone S., Vivaldi B., Pastorino P., Ferrari A., Abete M.C., Prearo M.
- 7 - **IL CASO POLCEVERA: GESTIONE DEL RISCHIO DOPO UN EVENTO STRAORDINARIO PER SALVAGUARDARE L'AMBIENTE E L'ITTIOFAUNA**
Maurella C., Pastorino P., Bona M.C., Ferrari A., Foglini C., Desiato R., Ru G., Prearo M., Bozzetta E.
- 8 - **STUDIO DELLE CORRELAZIONI TRA METALLI PESANTI E DEFORMITÀ SCHELETRICHE IN TROTE ASPROMONTANE**
Pizzata A., De Benedetto G., Giorgianni P., Di Caro G., Trombetta D., Macheda S., Smeriglio A., Salvo A., Siclari A., Macrì F., Marino F.
- 9 - **STUDIO ISTOLOGICO ED IMMUNOISTOCHEMICO DEL SISTEMA VASCOLARE SECONDARIO IN *CONGER CONGER***
Musmanno A.I.J., Macrì D., Ieni A., Corti I., Marino P., Marino F.
- 10 - **CISTI CARTILAGINEE DI ORIGINE PARASSITARIA IN ZEBRAFISH (*DANIO RERIO*)**
Iaria C., Cantarella S., Capparucci F., Briguglio G., Abbate J., Comisi D., Marino F.
- 11 - **APPLICAZIONE DI COLORAZIONI ISTOCHEMICHE ED IMMUNOISTOCHEMICHE PER L'IDENTIFICAZIONE DI PROTOZOI E MICROSPORIDI IN SPECIE ITTICHE MARINE**
Varello K., Gustinelli A., Quaglio F., Abbamonte G., Audino V., Prearo M., Caffara M., Bozzetta E., Fioravanti M.L.
- 12 - **CASO DI NEOPLASIA EMOCITARIA IN UN MITILO (*MYTILUS GALLOPROVINCIALIS*)**
Varello K., Francese D.R., Burioli E.A.V., Abbamonte G.1, Serracca L., Meistro S., Ercolini C., Prearo M., Bozzetta E.

- 13 - PRESENZA CONTEMPORANEA DI GONADI MASCHILI E FEMMINILI IN TROTE IRIDEA D'ALLEVAMENTO: CARATTERIZZAZIONE MORFOLOGICA ED ISTOLOGICA**
Francesco D.R., Righetti M., Pastorino P., Varello K., Burioli E.A.V., Pezzolato M., Arsieni P., Maldera O., Bozzetta E., Prearo M.
- 14 - RISCHI SANITARI DERIVATI DALLE SEMINE DI ITTIOFAUNA IN ACQUE PUBBLICHE: L'ULTIMO CASO**
Pastorino P., Foglini C., Righetti M., Dellerba D., Mignone W., Prearo M.
- 15 - MONITORAGGIO SANITARIO E AMBIENTALE IN CENTRI ESTETICI CHE UTILIZZANO GARRA RUFA IN PRATICHE DI FISH PEDICURE**
Righetti M., Pennazio R., Gridelli S., Serracca L., Foglini C., Pastorino P., Briata M.P., Prearo M.
- 16 - INDAGINE PRELIMINARE SUI FATTORI LIMITANTI L'ALLEVAMENTO DI SPECIE ITTICHE IN UN IMPIANTO DI ACQUACOLTURA A RICIRCOLO (RAS)**
Costa A., Fortino L., Costa A., Currò V., Gustinelli A., Quaglio F., Maccarrone M., Milano A.
- 17 - VALUTAZIONE DI UNA POSSIBILE GAMETOGENESI IN INDIVIDUI TRIPLOIDI DI OSTRICA *CRASSOSTREA GIGAS*. RISULTATI DEL PRIMO ANNO DI STUDIO**
Burioli E.A.V., Varello K., Gorla A., Bozzetta E., Prearo M.
- 18 - PROPRIETA' IMMUNOSTIMOLANTI DI PROTEC™ IN TROTA IRIDEA (*ONCORHYNCHUS MYKISS*)**
Bulfon C., Pacorig V., Sarti M., Luzzana U., Galeotti M., Volpatti D.
- 19 - BENESSERE, SALUTE ED INDIVIDUALITÀ IN AQUACOLTURA: IL PROGETTO WIN-FISH**
Fiocchi E., Manfrin A., Winberg S., Bégout M.L., Roque A., Villarroel M., Lembo G., Gesto M.
- 20 - DETERMINAZIONE DEL CONTENUTO IN METALLI NEI PRODOTTI D'ACQUACOLTURA: UN CASO STUDIO**
Squadrone S., Pastorino P., Prearo M., Serracca L., Burioli E.A.V., Stella C., Foglini C., Ercolini C., Abete M.C.

Workshop

"Criticità sanitarie di specie ittiche emergenti o riemergenti allevate in acqua dolce"

Moderatore Prof. Vittorio M. Moretti

Scuola di Specializzazione in "Allevamento, igiene e patologia delle specie acquatiche" - Università di Milano

14.30-15.00	Dr. Fernando Lunelli - FEM San Michele all'Adige. <i>L'allevamento del carpione (S. carpio): criticità ed opportunità.</i>
15.00-15.30	Dr. Mauro Vasconi - Università di Milano <i>Allevamento dei percidi, attualità e prospettive.</i>
15.30-16.15	Dr. Claudio Pedron - Storione Ticino Società Agricola Società Semplice - Cassolnovo (PV). <i>Allevamento e principali patologie degli storioni.</i>
16.15-16.45	Coffee break
16.45-17.15	Dr. Oliviero Mordenti - Università di Bologna <i>Riproduzione artificiale di anguilla europea: un esperimento di successo.</i>
17.15-18.00	Dr. Alessio Bonaldo - Università di Bologna <i>Stato dell'arte e nuove frontiere nella nutrizione delle specie ittiche dulciacquicole.</i>
18.00-18.30	Discussione e conclusioni
18.30	TEST ECM e Chiusura dei lavori

ABSTRACT

Comunicazioni orali

ISOLAMENTO E CARATTERIZZAZIONE DI RHABDOVIRUS DA UN GRAVE EPISODIO DI MORTALITA' IN PESCE GATTO

Bedendo G.^{1*}, Fortin A.¹, Buratin A.¹, Quartesan R.¹, Pretto T.², Pascoli F.¹, Toffan A.¹

1. Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro (PD), 2. Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Adria (RO).

Le malattie virali sono le patologie di più rilevante impatto economico in acquacoltura. La famiglia Rhabdoviridae ha come ospiti numerose specie ittiche, sia marine che di acqua dolce, presenti in Nord America, in Europa ed in Asia. Appartengono a questo gruppo di patogeni anche i virus IHNV, VHSV ed SVCV, agenti di patologie notificabili presso l'EU e l'OIE. Benché tutti i rhabdovirus causino generalmente gravi forme cliniche con ingenti tassi di mortalità, non per tutti sono ad oggi disponibili informazioni epidemiologiche precise e metodi diagnostici standardizzati. Nel presente lavoro viene presentato un caso di malattia causata da rhabdovirus in un allevamento veneto della zona di Noale (VE) in cui la specie colpita risultava essere esclusivamente *I. melas*.

L'Istituto Zooprofilattico delle Venezie è stato contattato nel mese di febbraio 2016 dal proprietario dell'allevamento per una sospetta malattia virale in seguito all'aumento di mortalità di un lotto di giovanili di pesce gatto di recente importazione ungherese. La temperatura dell'acqua era 18-19°C. Dai pesci gatto inviati in questa occasione veniva isolato European Catfish Virus (ECV). A questo primo contatto, a causa del perdurare della mortalità, hanno fatto seguito numerosi sopralluoghi in azienda, nel periodo compreso tra marzo e giugno (temperatura dell'acqua era di 20°C) In tali occasioni all'esame obiettivo i soggetti presentavano evidente sintomatologia nervosa con nuoto a spirale. La mortalità nell'allevamento si è arrestata nel mese di aprile con la perdita del 90% del lotto colpito. I soggetti sintomatici sono stati sottoposti ad indagine autoptica, esame batteriologico, parassitologico, istologico, virologico e microscopia elettronica. I pesci gatto apparivano cachettici, con evidente melanosi, inoltre presentavano rigonfiamento addominale e petecchie emorragiche alla base delle pinne, sul ventre e sulle branchie. All'apertura della cavità addominale si osservava: epatomegalia con aspetto marmorizzato, ipoplasia splenica, pallore renale e presenza di aria e contenuto fluido nello stomaco e nell'intestino. I pesci sono risultati negativi all'esame parassitologico e batteriologico, mentre all'esame virologico è stato isolato un agente virale su EPC e BF-2. Inaspettatamente, all'immunofluorescenza questi campioni sono risultati positivi per rhabdovirus del pesce gatto e negativi per ECV. Contestualmente sono state sviluppate metodiche di PCR con l'utilizzo di primers specifici per il gene N dei rhabdovirus, cui ha fatto seguito il sequenziamento parziale del gene stesso e l'analisi filogenetica per l'ulteriore caratterizzazione dell'isolato virale. Il rhabdovirus del pesce gatto, *I. melas*, rientra filogeneticamente nel *genus Spirivirus* di cui fanno parte anche SVCV, ma in un ramo distinto da quest'ultimo, assieme al rhabdovirus della tinca (TenRV).

L'esame sierologico, che ha richiesto la messa a punto di protocolli *ad hoc* basati sull'inibizione del 50% delle placche, ha confermato la natura virale dell'infezione e ha evidenziato lo sviluppo di buoni titoli anticorpali contro il rhabdovirus del pesce gatto negli animali sopravvissuti alla malattia. Gli stessi sieri sono sempre risultati negativi per anticorpi anti-ECV.

La rilevazione di elevati titoli anticorpali negli animali sopravvissuti fa presumere che gli animali sviluppino resistenza alla malattia ma questo dato andrebbe ulteriormente verificato.

ENCEFALO-RETINOPATIA VIRALE IN ORATA CAUSATA DA CEPPI RIASSORTANTI DI BETANODAVIRUS

Toffan A.^{1*}, Pascoli F.¹, Panzarin V.¹, Abbadi M.¹, Quartesan R.¹, Buratin A.¹, Pretto T.¹, Padros F.²

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie

²Servei de Diagnòstic Patològic en Peixos. Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain

L'encefalo-retinopatia virale (VER), nota anche come necrosi nervosa virale (NNV), è la più grave patologia virale che interessa le specie ittiche marine allevate. Tra le specie più sensibili alla malattia si annoverano: la spigola (*Dicentrarchus labrax*), il barramundi (*Lates calcarifer*), il dentice (*Pseudocaranx dentex*), il rombo (*Scophthalmus maximus*), la sogliola (*Solea senegalensis*), l'halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) e il merluzzo (*Gadus morhua*). In queste specie la VER è stata ampiamente descritta e documentata. Al contrario, l'orata (*Sparus aurata*) è stata storicamente considerata resistente alla forma clinica della malattia. Tale considerazione deriva principalmente dall'osservazione di campo che orate allevate in stretto contatto con spigole infette e sintomatiche non manifestano segni clinici né tantomeno mortalità. Inoltre, infezioni sperimentali di orate con betanodavirus hanno confermato le osservazioni di campo. Durante queste prove infatti, si è osservato che solo i gruppi sperimentali di larve, infettate per via intramuscolare, mostravano un aumento della mortalità, mentre gli animali adulti e i gruppi infettati per bagno non manifestavano alcun segno clinico, pur risultando positivi se sottoposti a isolamento virale e diagnosi biomolecolare. Pertanto per l'orata è stato ipotizzato un ruolo di "portatore sano" della malattia. E' necessario sottolineare che le suddette prove di infezione sperimentale sono state eseguite con virus RGNNV, il genotipo di betanodavirus prevalente nel Mediterraneo, nonché il più patogeno per la spigola.

Inaspettatamente, negli ultimi due anni, si sono moltiplicate le segnalazioni di episodi di mortalità elevate in larve/avannotti di *Sparus aurata*. In tutti i casi osservati è stata diagnosticata l'infezione da betanodavirus e tutti gli isolati virali sono stati caratterizzati come virus riassortanti RGNNV/SJNNV. I rilievi clinici e di laboratorio relativi a due grossi focolai di malattia verranno riportati nella presentazione. Alla luce dei risultati ottenuti, è stato ipotizzato uno spiccato tropismo d'ospite da parte dei virus riassortanti RGNNV/SJNNV per l'orata.

Un'analisi retrospettiva di tutti gli isolati presenti nella ceppoteca dell'IZSve ha permesso di recuperare ben 26 ceppi isolati da orata tra il 2000 e il 2016 provenienti da 4 diversi paesi europei. Di questi, 17 originavano da episodi di mortalità acuta in larve di orata e tutti sono stati caratterizzati geneticamente come RGNNV/SJNNV, supportando l'ipotesi che i riassortanti abbiano un tropismo preferenziale per l'orata.

L'orata è la specie più allevata nel Mediterraneo, con una produzione di 146.467 tonnellate nel 2014 (dati EAFP). L'aumento dell'incidenza della malattia in questa specie, l'elevata virulenza per le fasi larvali, il tropismo d'ospite esibito dai virus riassortanti e la scarsità di dati scientifici in materia, fanno emergere numerose preoccupazioni sull'impatto che tale malattia potrebbe avere sulla maricoltura Mediterranea.

Ricerca Finanziata dal Ministero della Salute (RC 09/15 IZSve)

ENCEFALO-RETINOPATIA VIRALE IN SPIGOLA *DICENTRARCHUS LABRAX*: NUOVE STRATEGIE DI IMMUNIZZAZIONE

Pascoli F.^{1*}, Nuñez-Ortiz N.², Buonocore F.², Stocchi V.², Picchiotti S.², Stratmann A.³, Scapigliati G.², Toffan A.¹

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, 35020 Legnaro (PD) Italy; ²Università della Tuscia, 01100 Viterbo, Italy; ³W42 Industrial Biotechnology GmbH, Germany

Il *Betanodavirus* è l'agente eziologico dell'encefalo-retinopatia virale (ERV), una delle più importanti patologie virali per l'acquacoltura marina, specialmente per la spigola (*D. labrax*). Ad oggi, non è disponibile in commercio nessuna strategia vaccinale per contrastare il diffondersi di questa malattia e prevenire le ingenti perdite economiche che causa negli allevamenti.

Presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie sono state condotte tre prove di vaccinazione, una per via intraperitoneale (IP) e due per bagno, alle quali sono poi seguiti i challenge con nodavirus. Nel caso della vaccinazione IP, due gruppi di giovanili di spigola sono stati vaccinati uno con una soluzione di nodavirus inattivato con formalina e l'altro con solo MEM a fungere da controllo. I risultati di questa prova hanno mostrato i) una risposta anticorpale IgM antigene-specifica nel siero sia tramite ELISA che in sieroneutralizzazione (SN) a 30 giorni post-vaccinazione (dpv); ii) una proliferazione di leucociti nelle branchie indotta dalla ERV; iii) una modulazione della trascrizione dei geni codificanti per IFN, Mx, ISG-2 e IgT in branchie; iv) una eccellente protezione, con RPS di 81,5.

Per quanto riguarda invece le prove sperimentali per bagno, due gruppi di giovanili di spigola sono stati immunizzati per immersione in una soluzione di virus inattivato in formalina per 2 minuti, con e senza un booster a 30 giorni dalla prima immunizzazione. Anche in questo caso un gruppo di controllo è stato immerso per lo stesso periodo in una soluzione contenente solo MEM. I risultati di questa prova hanno mostrato: i) nessuna sierconversione né IgM specifiche a 30 dpv; ii) nessuna proliferazione leucocitaria *in vitro* a livello branchiale; iii) una lieve modulazione nella trascrizione dei geni codificanti per IFN, Mx, ISG-2 e IgT in branchie; iv) presenza di *Betanodavirus* a livello branchiale evidenziata dall'immunoistochimica; v) nessuna protezione (RPS 2,4).

L'ultima prova è stata eseguita su un gruppo di giovanili di spigola immunizzati per bagno come sopra descritto, con successivo richiamo orale a 30 dpv con mangime addizionato con cellule di *Pichia pastoris* ingegnerizzate per esprimere la proteina capsidica di *Betanodavirus*. I risultati hanno mostrato: i) una bassa, ma evidente, sierconversione con IgM specifiche a 30 dpv; ii) una proliferazione leucocitaria a livello branchiale *in vitro* indotta da ERV; iii) una significativa modulazione della trascrizione dei geni codificanti per IFN, Mx, ISG-2 e IgT; iv) presenza di *Betanodavirus* nella mucosa intestinale osservata tramite immunoistochimica; v) una moderata protezione, con RPS di 29,6.

In conclusione, i risultati mettono in evidenza l'efficacia di una singola dose vaccinale di virus inattivato somministrato via IP nel proteggere le spigole dall'insorgenza della ERV. Di contro, la sola vaccinazione per bagno effettuata come sopra descritto non è stata sufficiente a contrastare l'insorgere della patologia e la conseguente mortalità. Infine, i risultati ottenuti con nel gruppo che ha ricevuto il booster per via orale, nonostante richiedano ulteriori approfondimenti, sono molto promettenti e suggeriscono un nuovo interessante approccio per combattere questa importante patologia.

Questo studio è finanziato dal progetto EU 7FP TARGETFISH (Grant Agreement 311993)

INFEZIONE DA *BETANODAVIRUS*: INDAGINE SUL RUOLO DELLA VONGOLA FILIPPINA (*RUDITAPES PHILIPPINARUM*)

Volpe E.^{1*}, Pagnini N.², Serratore P.¹, Ciulli S.¹

¹Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Università di Bologna, Viale Vespucci, 2, 47042 Cesenatico, FC, Italia;

²Campus di Cesena, Università di Bologna, Viale Vespucci, 2, 47042 Cesenatico, FC, Italia.

I molluschi bivalvi, nutrendosi per filtrazione, sono in grado di concentrare e rilasciare molteplici microrganismi, fra i quali anche alcuni patogeni dei pesci, pertanto la coabitazione di vertebrati ed invertebrati marini può condizionare l'epidemiologia delle malattie infettive dei pesci. In particolare, i molluschi bivalvi possono influenzare le dinamiche dei patogeni ittici potendosi comportare da serbatoio o da barriera per batteri e virus. Questo tipo di interazione è stato studiato per varie malattie dei salmonidi, per valutare se l'uso di sistemi di acquacoltura multitrofica integrata (IMTA) potesse favorire o sfavorire la diffusione di determinate patologie infettive. Recentemente impianti di IMTA sono stati proposti anche per specie ittiche Mediterranee, ma al momento non esistono studi che verifichino la possibile interazione di microrganismi patogeni per le specie ittiche del Mediterraneo e i molluschi bivalvi.

In questo studio è stata indagata la capacità della vongola verace filippina (*Ruditapes philippinarum*) di accumulare *Betanodavirus*, quando esposta ad un ambiente contaminato, e di rilasciarlo in acqua marina.

A tal fine sono state allestite prove di bioaccumulo e di depurazione con alcuni lotti di vongole in precedenza testate e risultate negative alla presenza di *Betanodavirus*. Le vongole sono state, inizialmente, mantenute in acqua marina sperimentalmente contaminata con un titolo finale di *Betanodavirus* di 10^5 TCID₅₀/ml. Le vongole sono state campionate ad intervalli regolari e la quantità di virus presente nell'epatopancreas è stata determinata tramite isolamento di diluizioni al punto finale. La TCID₅₀ è stata calcolata con il metodo di Spearman-Kärber.

Le vongole immerse in acqua contaminata hanno mostrato la capacità di accumulare progressivamente *Betanodavirus* e di trattenerlo anche in seguito al loro trasferimento in acqua marina pulita. L'accumulo del virus avveniva rapidamente e già dopo tre ore di immersione in acqua contaminata si registravano titoli virali superiori a $10^{3.1}$ TCID₅₀/g. L'accumulo incrementava nel tempo raggiungendo titoli virali medi di $10^{4.5 \pm 1.1}$ TCID₅₀/g dopo 24 ore di esposizione al virus. Le vongole non hanno manifestato alterazioni né mortalità a seguito della presenza di *Betanodavirus* a livello dell'epatopancreas. Le vongole hanno poi mostrato la capacità di trattenere il virus vivo anche quando re-immesse in acqua marina pulita per 7 giorni. Il virus vivo, infatti, è stato ritrovato nell'epatopancreas di vongole in precedenza contaminate e poi immerse in acqua pulita, anche quando le vongole erano sottoposte a lavaggio e cambio (100%) giornaliero di acqua. Inoltre, virus vivo è stato re-isolato, sebbene a bassi titoli virali ($<10^{1.8}$ TCID₅₀/ml) anche dall'acqua in cui erano state re-immesse le vongole, nonostante l'acqua fosse sottoposta a cambi quotidiani, dimostrando un rilascio giornaliero del virus fino a 4 giorni post esposizione. Infine, la presenza di *Betanodavirus* vivo e vitale è stata indagata anche a livello del materiale fecale rilasciato dalle vongole ritrovandolo fino a 7 giorni di depurazione.

Il fatto che *Betanodavirus* persista in vongole esposte al virus e che sia rilasciato in acqua da esse tramite il materiale fecale pone il rischio di esposizione al virus per i pesci mantenuti in stretta vicinanza con le vongole.

I ridotti titoli virali riscontrati nell'acqua di depurazione fanno ipotizzare un basso rischio di esposizione per eventuali pesci allevati nelle vicinanze, mentre le vongole potrebbero rappresentare una consistente fonte di virus per quei pesci che abitualmente consumano i molluschi bivalvi fra i quali sono annoverate anche specie ittiche sensibili all'infezione da *Betanodavirus*, quali l'orata (*Sparus aurata*).

La ricerca oggetto del presente lavoro è stata volta nell'ambito di un progetto finanziato dal DIMEVET.

OSTREID HERPESVIRUS TIPO 1 E *VIBRIO AESTUARIANUS*: STUDIO DI DUE IMPORTANTI PATOGENI DELL'OSTRICA CONCAVA NEL CONTESTO ITALIANO

Burioli E.A.V.^{1*}, Houssin M.², Bona M.C.¹, Fioravanti M.L.³, Riina M.V.¹, Prearo M.¹

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta; ²LABEO, Frank Duncombe Laboratoires, Caen, France; ³Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Alma Mater Studiorum, Ozzano Emilia (BO)

L'ostrica del Pacifico *Crassostrea gigas* mostra un'elevata capacità di adattamento alle condizioni ambientali estreme, una cospicua tolleranza all'inquinamento ed una resistenza alle principali malattie parassitarie che colpiscono gli altri bivalvi. Tuttavia dal 2008, gli allevamenti devono affrontare gravi eventi di mortalità, che possono essere di due tipi in base all'età degli individui colpiti. Il fenomeno osservato nelle larve e negli stadi giovanili è essenzialmente riconducibile all'infezione da OsHV-1 ed in particolare al genotipo μ Var, considerato uno dei più seri patogeni odierni per *C. gigas* e *C. angulata*, mentre si sospetta fortemente che le mortalità in individui adulti siano da ascrivere alla presenza di *Vibrio aestuarianus*. Il contatto inevitabile tra popolazioni allevate e popolazioni selvatiche e le eccellenti capacità dell'acqua come veicolo di agenti infettivi, hanno evidenziato la necessità di raccogliere preziose informazioni epidemiologiche utili alla valutazione del rischio di introduzione di patogeni in banchi selvatici indenni da parte di individui infetti destinati all'allevamento, o viceversa, di evidenziare un eventuale ruolo di serbatoio svolto dalle popolazioni selvatiche, che possono mettere a rischio gli allevamenti circostanti. Durante la primavera 2012 e l'estate 2014, sono stati raccolti 600 individui di ostrica concava da banchi selvatici in 12 siti, rappresentativi di diversi tipi di ambienti (laguna, golfo, mare aperto e porto), lungo le coste italiane. La presenza e la carica dei due patogeni, OsHV-1 e *V. aestuarianus* è stata determinata tramite PCR real-time. La loro presenza è stata poi definita in termini di prevalenza ed è stata indagata l'associazione ad eventuali fattori di rischio come taglia, tipo di ambiente e anno di campionamento. La prevalenza di OsHV-1, considerando i diversi siti, variava da 0 a 26,7% mentre nessun individuo è risultato positivo per *V. aestuarianus*, secondo il valore soglia definito dalla metodica. Infine, negli individui risultati positivi per OsHV-1, sono state esplorate tre zone del genoma virale tramite sequenziamento: ORFs4/5 (regione C), ORFs42/43 (regione IAP) e ORFs35-38. Le sequenze della regione C ed i concateneri risultanti dai tre *loci* target sono state utilizzate per condurre l'analisi filogenetica dei genotipi virali riscontrati in Italia. Il nostro studio ha evidenziato, nei banchi selvatici, la presenza di 9 genotipi ed una distribuzione geografica di alcune varianti. Un genotipo molto vicino al μ Var è stato rilevato in tutti i siti campionati. Dall'albero filogenetico ottenuto per la regione C, e per la quale sono disponibili su GenBank numerose sequenze tratte da campioni provenienti da diverse zone del mondo, è stato possibile evidenziare che tutti i genotipi prossimi al μ Var sono stati isolati esclusivamente da individui europei, ad eccezione di due campioni provenienti da larve da uno schiuditoio coreano. Diversamente, anche se posizionati in rami ben separati, due genotipi isolati durante il presente studio sono risultati filogeneticamente vicini al genotipo di riferimento, a genotipi isolati in Estremo Oriente in bivalvi non *Ostreidae* e all'Acute Viral Necrosis Virus (AVNV), che colpisce il canestrello cinese *Chlamys farreri*.

Il ritrovamento del virus, durante il presente studio, in regioni lontane da quelle dedicate alla molluschicoltura e la presenza di diversi genotipi suggeriscono un'introduzione remota del patogeno nelle acque italiane. L'elevata diversità del virus osservata nell'ambiente naturale italiano e riportata fino ad oggi solo in Estremo Oriente, rispetto ad altri studi condotti in Europa, potrebbe tuttavia essere giustificata dal fatto che questi ultimi hanno al contrario coinvolto esclusivamente individui allevati. Le condizioni di allevamento, caratterizzate di una debole variabilità genetica degli ospiti, potrebbero dunque essere responsabili di un alto grado di specializzazione del virus.

STURGEON IRIDOVIRUS: DAL FOCOLAIO ALLA DIAGNOSI DI LABORATORIO

Caruso C.¹, Pedron C.², Prato R.^{1*}, Toffan A.³, Bigarré L.⁴, Pastorino P.¹, Burioli E.A.V.¹, Righetti M.¹, Fogliani C.¹, Masoero L.¹, Prearo M.¹

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino; ²Medico Veterinario, Settala (MI); ³Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro (PD); ⁴ANSES, Université Bretagne-Loire, Plouzané, France

Negli ultimi decenni, la produzione di storioni in Europa occidentale si è assestata intorno alle 1.300 tonnellate, rivelando un trend in costante aumento, con l'Italia che rappresenta ancora il primo paese in Europa per la storionicoltura. Il 95% della produzione mondiale annuale è diluita su 3 specie di importanza fondamentale: 43% storione bianco (*Acipenser transmontanus*), 34% storione siberiano (*Acipenser baerii*) e 18% storione adriatico (*Acipenser naccarii*). L'allevamento intensivo ha ovviamente favorito l'origine e la diffusione di malattie emergenti ad eziologia virale, tra cui i membri della famiglia *Iridoviridae* che stanno guadagnando sempre più importanza scientifica. La prima segnalazione di Iridovirus negli storioni (*A. transmontanus*) risale ai primi anni '80 in America del Nord. Successivamente, altri iridovirus o iridovirus-like (Namao virus) sono stati riportati in storioni nel Missouri e in storioni di lago (*A. fulvescens*). Recentemente, Bigarré et coll., (2016) hanno segnalato per la prima volta un nuovo iridovirus in diverse specie di storioni, tra cui storioni russi (*A. gueldenstaedtii*), dimostrando la circolazione di due distinti ceppi in Europa: il primo risulterebbe geneticamente correlato al Namao virus, mentre il secondo rappresenterebbe un ceppo emergente, provvisoriamente denominato *Acipenser Iridovirus Europeo* (AcIV-E). I meccanismi patogenetici e il decorso della malattia provocata da AcIV-E sono tutt'ora da chiarire. L'insorgenza della patologia riscontrata in gruppi di storioni russi con sistema a vasche non comunicanti ed il successivo diffondersi della malattia dai soggetti malati a quelli sani, fa sospettare che la trasmissione possa avvenire sia per via verticale che orizzontale, similmente a quanto segnalato dagli autori americani per l'Iridovirus di *A. transmontanus*. L'esordio della patologia si osserva in soggetti di peso variabile dai 10-15 g (episodi precoci) fino ai 250-350 g (episodi tardivi), con decorso acuto/iperacuto (evoluzione più tumultuosa, picchi di mortalità giornaliera più alti) nei gruppi di storioni più giovani. La sintomatologia risulta specifica (osservazioni comuni raccolte in diversi focolai), ma non patognomica: ipereccitabilità/iperattività motoria del pesce in vasca, accompagnata dalla comparsa di movimenti anomali, incremento di accelerazioni a scatto e atteggiamento a "candela" (il pesce staziona in posizione quasi verticale, scuotendo la testa, che risulta parzialmente o totalmente fuori dall'acqua), "flashing", depigmentazione cutanea generalizzata, ipermucosità e alterazioni macroscopiche delle branchie. In fase conclamata/tardiva della malattia sono stati osservati anche enoftalmo, anoressia e rigonfiamento addominale. In laboratorio, considerata la difficoltà di isolamento degli Iridovirus su monostrati cellulari, la diagnosi virologica di AcIV-E è possibile solo attraverso l'utilizzo di metodiche biomolecolari che consentono una tempestiva individuazione del focolaio. Per l'analisi di prima istanza, è stata allestita una metodica Real time PCR che utilizza una coppia di primers e una sonda marcata FAM/BHQ disegnati su sequenze disponibili in GenBank (accession number DQ897645) del gene codificante la proteina maggiore del capsido. La metodica ha una sensibilità di 10¹ copie/μl e non cross-reagisce con altri virus a DNA dei pesci, quali ECV, EHN, LCDV, AcHV-2, AngHV, IctHV e KHV. I risultati preliminari di RT-PCR effettuati in storioni russi sintomatologici, hanno dimostrato che la carica virale maggiore (espressa in copie DNA/μl) è stata riscontrata nelle branchie (10⁵ copie/μl) che, di fatto, sembrano rappresentare l'organo target di AcIV-E. Al momento non è stata individuata alcuna terapia risolutiva. Allo stesso modo, una terapia di sostegno con integratori vitaminici o mineral-vitaminici (prove sperimentali con somministrazione in acqua o per iniezione) sembra non avere alcun riflesso positivo. La mancanza di dati epidemiologici e i meccanismi patogenetici non chiari, obbligano l'approfondimento delle conoscenze circa AcIV-E, al fine di mettere in atto misure di profilassi diretta e indiretta con l'obiettivo di contenere l'insorgenza, l'andamento e gli effetti della patologia.

INDAGINE EZIOLOGICA IN FOCOLAI DI MORTALITÀ IN STORIONE RUSSO (*ACIPENSER GUELLENSTAEDTII*) E STORIONE SIBERIANO (*ACIPENSER BAERII*)

Volpe E.¹, Sirri R.¹, Passalacqua P.L.¹, Cesa Bianchi F.², Serratore P.¹, Mandrioli L.¹, Ciulli S.^{1*}

¹Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Università di Bologna, Viale Vespucci, 2, 47042 Cesenatico, FC, Italia;

²Campus di Cesena, Università di Bologna, Viale Vespucci, 2, 47042 Cesenatico, FC, Italia.

Recentemente, l'Italia è diventata il secondo produttore mondiale di caviale con 25 tonnellate annue prodotte, al pari della Russia. Il caviale è prodotto da differenti specie di storioni tra cui lo storione russo (*Acipenser gueldenstaedtii*) e quello siberiano (*Acipenser baerii*). L'incremento dei volumi produttivi impone una maggiore attenzione alle possibili cause di malattie infettive che incidono sulla produttività degli allevamenti. Vari agenti infettivi batterici e virali sono stati in descritti in storioni allevati in Europa e sporadicamente associati a focolai di mortalità. A livello mondiale la prima causa di mortalità nell'allevamento degli storioni è dovuta ad infezioni da herpesvirus e iridovirus. I virus comunemente identificati come iridovirus, sono attualmente inclusi nel gruppo dei virus nucleo-citoplasmatici a grande DNA (NCLDV) assegnati al nuovo ordine proposto 'Megavirales' e sono frequentemente ritrovati in Nord America associati a focolai di malattia con mortalità in varie specie di storione.

Nel 2015, alcuni focolai di malattia si sono verificati in un allevamento di storioni nel nord Italia, registrando differenti valori di mortalità cumulativa tra le due specie coinvolte: *A. baerii* e *A. gueldenstaedtii*, pari a 50% e 90% rispettivamente. I soggetti colpiti mostravano segni clinici quali letargia, anoressia, livrea chiara, nuoto erratico e circolare. Per indagare le cause eziologiche, sono stati effettuati due campionamenti: il primo durante il focolaio ed il secondo a focolaio terminato. I soggetti campionati appartenevano a differenti lotti produttivi caratterizzati da differente età, taglia ed origine. In particolare, il primo campionamento ha interessato un lotto di *A. baerii* ed uno di *A. gueldenstaedtii* con segni clinici. Nel secondo campionamento sono stati prelevati animali dagli stessi lotti nei quali non erano più osservabili i segni clinici. Sono stati inoltre campionati soggetti di altri due lotti di *A. gueldenstaedtii* presenti in azienda, in uno dei quali si osservavano i segni clinici e una mortalità cumulativa del 70%, mentre nell'altro non si registrava mortalità e segni clinici da circa quattro mesi.

All'istologia si osservavano in cute e branchie alcune cellule epiteliali ipertrofiche e citomegaliche con inclusioni citoplasmatiche anfoteriche e nucleo eccentrico; nelle branchie era presente anche una diffusa necrosi delle cellule pillar. Le analisi batteriologiche effettuate hanno evidenziato la presenza di *Acinetobacter johnsonii* sia in storione russo che siberiano, mentre *A. tjernbergiae* e *Aeromonas sobria* sono stati isolati in storione siberiano. I batteri sono stati isolati solamente dai soggetti prelevati nel corso del primo focolaio di malattia. Al fine di rilevare virus appartenenti al gruppo dei virus nucleo-citoplasmatici a grande DNA (NCLDV) nei campioni analizzati, uno specifico set di primer è stato disegnato su un allineamento costruito con le sequenze già disponibili in GenBank dei NCLDV Nord Americani (British Columbia white sturgeon virus, Namao virus, Shortnose sturgeon virus, Missouri River sturgeon iridovirus, White sturgeon iridovirus). Le analisi virologiche hanno rilevato la presenza di questo virus in tutti i campioni esaminati. Il sequenziamento del genoma virale ritrovato nei lotti analizzati risultati positivi ha riportato la completa somiglianza (100% identità amminoacidica) tra le sequenze ottenute dai diversi lotti coinvolti nel focolaio. Inoltre, il virus identificato per la prima volta in Italia ha riportato la maggiore somiglianza (96,5% identità amminoacidica) con il Namao virus e la più bassa somiglianza (79,5% identità amminoacidica) con il white sturgeon iridovirus. Il virus evidenziato, denominato European sturgeon NCLDV è stato individuato come la causa primaria dei focolai di mortalità osservati in *A. baerii* e *A. gueldenstaedtii* allevati in nord Italia. In due lotti coinvolti nei focolai si è evidenziata anche la presenza di co-infezioni causate da batteri dei generi *Acinetobacter* e *Aeromonas* che probabilmente sono responsabili di infezioni secondarie. Contemporaneamente alla presente segnalazione sono stati riportati casi di malattia e mortalità in storioni associati a virus geneticamente correlati ai NCLDV in tre paesi dell'Europa occidentale.

INDAGINE SULLA PATOGENICITÀ DI CEPPI MOBILI DI *AEROMONAS* SPP. ISOLATI DA SPECIE ITTICHE

Borella L.^{1*}, Moretti V.M.¹, Alborali G.L.², Scali F.², Salogni C.²

¹ Università degli Studi di Milano, Dipartimento di Scienze Veterinarie per la Salute, la Produzione Animale e la Sicurezza Alimentare (MI); ² Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Sezione Diagnostica di Brescia.

Lo studio della patogenicità di *Aeromonas* spp. è caratterizzato da notevole complessità, sviluppandosi in genere su più livelli e comprendendo saggi biologici in vitro (linee cellulari) ed in vivo (modelli animali), esami molecolari ed analisi delle proprietà fenotipiche degli isolati.

Nell'ambito di una tesi di specialità (Allevamento, Igiene, Patologia delle Specie Acquatiche e Controllo dei Prodotti Derivati – UNIMI, Sezione Diagnostica di Brescia - IZSLER) sulla caratterizzazione in vitro della virulenza di questi microrganismi, sono stati esaminati 101 ceppi di *Aeromonas* mobili, provenienti da specie ittiche selvatiche (69), allevate (26) ed ornamentali (6). L'isolamento è avvenuto da pesci setticemici (27) ed apparentemente sani (74). Per ciascuno degli isolati, identificati biochimicamente a livello di complex, sono state analizzate le proprietà citotossiche su tre diverse linee cellulari (EPC, BF2, Vero) ed una serie di caratteristiche colturali (crescita a 37°C, emolisi), biochimiche (test VP, decarbossilazione della lisina, fenomeno del suicidio) ed enzimatiche (lipasi, gelatinasi) indicate in letteratura come potenziali fattori di virulenza di *Aeromonas* spp. In particolare, si è indagato sulla correlazione fra questi fattori, la fenospecie dei ceppi (*A. hydrophila*, *A. sobria*, *A. caviae*), la provenienza (selvatica, allevata) ed il quadro clinico delle specie ittiche d'isolamento.

In generale, lo studio ha registrato alte prevalenze (54.5-99.0%) dei potenziali indicatori di patogenicità all'interno del campione testato. La produzione di lipasi (98.0%) e gelatinasi (99.0%) è stata il fattore più frequentemente riscontrato. Anche le caratteristiche colturali/biochimiche hanno mostrato un'ampia diffusione fra i ceppi esaminati, con prevalenze variabili dal 70.3% (crescita a 37°C) al 94.1% (fenomeno del suicidio: attività non suicida). L'attività citotossica ha rappresentato il fattore di virulenza meno prevalente (54.5%).

Dai risultati è emersa una correlazione della capacità di crescita a 37°C, dell'attività emolitica e citotossica con la fenospecie dei ceppi, in particolare con i complex *A. caviae* (crescita a 37°C) ed *A. hydrophila* (attività emolitica e citotossica). Ad esclusione dell'azione decarbossilasica sulla lisina, prevalente negli isolati selvatici, nessuno dei *markers* di virulenza è risultato associato all'origine dei ceppi. Solamente la crescita a 37°C è stata correlata con presenza di patologia nei pesci, indicando una scarsa significatività dei fattori fenotipici analizzati nella caratterizzazione in tal senso della patogenicità di *Aeromonas* spp.

Nei sistemi cellulari testati, le cellule Vero si sono dimostrate le più sensibili alle citotossine prodotte da *Aeromonas* spp. Si ritiene comunque che l'importanza di utilizzare le cellule Vero sia legata, oltre ad una migliore visualizzazione dell'effetto citopatico, anche alla possibilità di individuare ceppi in grado di esprimere il loro potenziale patogeno nei mammiferi e nell'uomo, il quale andrebbe però confermato mediante l'impiego dei tradizionali modelli animali.

Ulteriori studi si rendono necessari per meglio definire il significato clinico dei fattori di virulenza di *Aeromonas* spp. nei pesci, da eseguirsi su un maggior numero di isolati ed associando l'esame dei caratteri fenotipici dei ceppi alle analisi molecolari e, soprattutto, alle prove biologiche in vivo.

SVILUPPO DI UNA MULTILOCUS SEQUENCE ANALYSIS PER L'IDENTIFICAZIONE DEI *VIBRIO* APPARTENENTI AL CLADE SPLENDIDUS E APPLICAZIONE DELLA METODICA DURANTE UN EVENTO DI MORTALITÀ IN MOLLUSCHI

Burioli E.A.V.^{1*}, Oden E.², Trancart S.², Prearo M.¹, Houssin M.²

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino; ²LABEO, Frank Duncombe Laboratoires, Caen, France.

L'allevamento dei molluschi bivalvi rappresenta una parte rilevante dell'acquacoltura europea con più di 630.000 tonnellate prodotte nel 2014 (FAO). Tuttavia, ciclicamente, il comparto è colpito da gravi epizootie come quella subita negli anni 70, riconducibile ad un iridovirus e che ha condotto all'abbandono dell'allevamento dell'ostrica Portoghese *Crassostrea angulata* in Francia. Negli ultimi anni, si osserva una recrudescenza degli eventi di mortalità nei bivalvi, sia in termini di frequenza che di specie colpite e l'insorgenza di nuovi patogeni come l'OsHV-1 e *Vibrio aestuarianus*. Nella primavera 2014, gli stock allevati di *Mytilus* spp. della regione francese delle Charentes-Maritimes hanno subito delle perdite fino al 80%, in tutte le classi di età. Nel 2015, il fenomeno si è diffuso ad altre regioni e ha colpito i mitili su un vasto arco temporale, provocando in alcune aree la scomparsa di interi banchi naturali. Anche nel Golfo di La Spezia, lo stesso anno, sono state osservate delle mortalità dal 30 all'80% in *Mytilus galloprovincialis*, dove la presenza di vibrioni è stata osservata dall'IZS delle Venezie nei preparati istologici provenienti da individui moribondi. La ricerca di agenti eziologici della lista OIE ha dato, in ogni caso, un esito negativo e tra i patogeni conosciuti sono stati isolati solo dei *Vibrio* appartenenti al clade Splendidus. Questo gruppo è composto da più di 15 specie strettamente imparentate e comprende alcuni ceppi riconosciuti patogeni per i bivalvi. Tuttavia, diversi studi, mostrano una loro predominanza anche nei tessuti di molluschi sani, durante tutto l'anno, lasciando intuire che sono parte della normale flora batterica associata ai bivalvi. Inoltre, le specie batteriche appartenenti a questo gruppo sono fenotipicamente e filogeneticamente molto vicine e soggette ad eventi di ricombinazione genica, rendendo poco accurata la loro identificazione tramite l'analisi di un singolo gene o l'utilizzo del MALDI-TOF. La dimostrazione di una correlazione tra l'isolamento di un ceppo appartenente a questo clade e l'insorgenza di mortalità è quindi molto delicata e si evidenziava la carenza di un potente tool diagnostico in grado di fornire una risposta accurata.

Il presente lavoro riporta le attività di sviluppo di una Multilocus Sequence Analysis (MLSA), basata su frammenti di 5 geni costitutivi (*atpA*, *ftsZ*, *mreB*, *rpoD* and *topA*), specifica per l'identificazione e la classificazione di *Vibrio* appartenenti al clade Splendidus e l'applicazione della metodica in campo, su ceppi isolati in campioni di cozze prelevati durante e fuori dai periodi di mortalità. La patogenicità dei singoli isolati è stata poi testata attraverso infezioni sperimentali. Tra i ceppi appartenenti al clade Splendidus, isolati primariamente dagli individui moribondi, è stato individuato un ceppo in grado di indurre 80% di mortalità nei lotti infettati sperimentalmente ed è stato identificato come *V. splendidus sensu stricto* dalla nostra MLSA.

CERTEZZE, MANCANZE E PROSPETTIVE FUTURE SU *AMYLOODINIUM OCELLATUM*

Massimo M.*, Beraldo P., Bulfon C., Volpatti D., Galeotti M.

Dipartimento di Scienze Agroalimentari, Ambientali e Animali, Università degli Studi di Udine, Udine (UD)

Amyloodinium ocellatum (phylum *Dinoflagellata*) unica specie appartenente al genere *Amyloodinium*, è un protozoo ectoparassita obbligato di pesci di acqua salata e salmastra. È responsabile della malattia nota come amyloodinosi, oodinosi o malattia del velluto, infezione che si registra soprattutto nelle aree con climi temperati caldi. A differenza di altri parassiti, *A. ocellatum* non ha un ospite definitivo specifico e, come confermato dalla letteratura, è stato isolato in più di cento specie ittiche diverse, ma anche in crostacei (Aravindan *et al.* 2007), plattelminti monogeni (Colorni, 1994) e in elasmobranchi (Lawler, 1980). *A. ocellatum* rappresenta un serio problema sia per i pesci d'allevamento, sia per i pesci d'acquario, anch'essi ospiti confermati del dinoflagellato (Landsberg *et al.*, 1994). L'amyloodinosi può essere letale per l'ospite, infatti, se le condizioni ambientali sono favorevoli e la specie ittica sensibile, si possono registrare tassi di mortalità anche del 100%. Tuttavia, la mortalità così come la morbilità e la prevalenza possono variare grandemente a seconda della tipologia d'allevamento, della carica parassitaria, della specie ittica considerata e della stagione (Overstreet, 1993; JiannHsiung *et al.*, 2001; Kuperman *et al.*, 2001; Saraiva *et al.*, 2011; Mladineo, 2006; Bahri, 2012; Guerra-Santos *et al.*, 2012; Bonucci-Moreira *et al.*, 2013). Benché pericoloso e responsabile di ingenti danni produttivi e economici, al momento non esistono trattamenti contro *A. ocellatum* che siano economicamente convenienti, efficaci e registrati ad uso veterinario. La formalina e il solfato di rame, ad esempio, sono efficaci sulle dinospore (stadio liberamente natante di *A. ocellatum*) e sui trofonti (stadio sessile di *A. ocellatum*), tuttavia, sono tossici per i pesci e inquinanti ambientali e perciò il loro impiego non è consentito (sebbene ufficiosamente tollerato) in Italia e in molti stati europei.

Nella prospettiva di trovare delle terapie alternative efficaci contro il dinoflagellato ma rispettose dell'ambiente e del benessere animale, si inserisce il progetto europeo "ParaFishControl" (Horizon 2020). Il progetto, avviato nel 2015, può contare sulla partecipazione di 29 unità lavorative europee e ha come obiettivo complessivo l'incremento della sostenibilità e competitività dell'acquacoltura europea mediante il controllo, la prevenzione e la mitigazione dei principali parassiti affliggenti le specie ittiche maggiormente allevate. L'analisi del rischio dei parassiti in acquacoltura è una delle attività pianificate dal progetto, che nella fase iniziale ha previsto la raccolta e analisi della letteratura scientifica sui vari parassiti indagati. Il nostro gruppo ha, quindi, condotto la ricerca bibliografica su *A. ocellatum*, utilizzando PRIMO, il portale per ricerche su collezioni cartacee ed elettroniche dell'Ateneo di Udine, i motori di ricerca PubMed, Web of Science e Google. I dati ricavati dalle pubblicazioni hanno implementato un database su foglio di lavoro Excel, al fine di facilitare l'estrapolazione delle informazioni tramite l'uso dei filtri. Da detta letteratura è stato possibile ricavare la storia ecologica e biologica di questo famigerato parassita; tuttavia, accanto a queste certezze, raccontate nel tempo da molti autori, permangono ancora delle lacune, tra cui dati sul comportamento del parassita in alcune fasi del suo ciclo biologico e/o in determinati contesti climatici.

Il fine di questa ricerca, che proseguirà anche nei prossimi anni, è pertanto quello di implementare le informazioni già in possesso su *A. ocellatum*, cercando di colmare le lacune ancora residue. Questo consentirà una migliore comprensione della biologia del protozoo nella prospettiva di limitarne l'impatto in acquacoltura mediante lo sviluppo di cure sostenibili ed efficaci. Infatti, nel progetto è pianificata anche la messa a punto di terapie alternative, come l'impiego di composti attivi di piante, e di strategie di profilassi indiretta, come la formulazione di un vaccino specifico contro *A. ocellatum*, sebbene sia un'ardua aspettativa futura.

INDAGINE SUL POSSIBILE IMPATTO DELLA MALATTIA PROLIFERATIVA RENALE (MPR) SULLE POPOLAZIONI DI SALMONIDI DELL'ALTO ADIGE

Gustinelli A.^{1*}, Caffara M.¹, Menconi V.¹, Grund H.², Merlo N.², Pircher A.³, Quaglio F.⁴, Fioravanti M.L.¹

¹Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Alma Mater Studiorum Università di Bologna, Ozzano Em. (BO); ²Ufficio Caccia e Pesca, Provincia di Bolzano; ³Servizio Veterinario aziendale dell'Azienda Sanitaria dell'Alto Adige/Südtirol-comprendorio sanitario di Merano; ⁴Dipartimento di Biomedicina Comparata ed Alimentazione, Università di Padova, Legnaro (PD)

La Malattia Proliferativa Renale (MPR) o Proliferative Kidney Disease (PKD) è un'importante malattia parassitaria dei salmonidi sostenuta da *Tetracapsuloides bryosalmonae* (Myxozoa, Malacosporea) che viene trasmessa ai pesci mediante spore rilasciate in acqua da briozoi dulciacquicoli. Al momento si ritiene che solo *Salmo trutta*, *Salvelinus* spp. e ceppi nord-americani di trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*) rientrano attivamente nel ciclo biologico di *T. bryosalmonae*, sviluppando ed eliminando spore infettanti per i briozoi, mentre le trote iridee di ceppo europeo ed altri salmonidi del genere *Salmo* e *Oncorhynchus* non sarebbero idonei a produrre spore infettanti e rappresenterebbero ospiti a fondo cieco nei quali la malattia si sviluppa in modo molto più grave. Alcuni studi recenti hanno però posto in relazione l'infezione da *T. bryosalmonae* con il declino delle popolazioni selvatiche di salmone atlantico (*Salmo salar*) in Norvegia e di trota fario in Svizzera ed in Danimarca. In seguito all'osservazione di una forte diminuzione delle popolazioni di salmonidi selvatici nei fiumi dell'Alto-Adige si è deciso quindi di intraprendere un monitoraggio volto a comprendere l'eventuale ruolo della MPR nel determinismo di tale fenomeno. Le ricerche sono state condotte da aprile a novembre 2013 e sono stati effettuati 4 campionamenti mediante elettrostorditore nei mesi di aprile, giugno, luglio e settembre per ognuno dei fiumi Adige, Passirio, Isarco e Rienza. Sono stati inoltre sottoposti a campionamento tre allevamenti di trote situati in bacini idrografici siti nella Provincia di Bolzano. Nel corso della ricerca sono state esaminate in totale 238 trote selvatiche, di cui 65 *S. trutta fario*, 70 *S. trutta marmorata*, 102 soggetti ibridi ed un unico esemplare di trota iridea pescato nel fiume Passirio. Per quanto riguarda gli allevamenti sono stati esaminati 154 pesci, di cui 140 trote marmorate e 14 trote fario. Ogni esemplare campionato veniva sottoposto ad esame anatomico-patologico e da ogni soggetto venivano eseguite sul campo impronte di rene e milza successivamente colorate con la metodica di May-Grünwald-Giemsa; porzioni di rene, milza, fegato, branchie, cervello ed intestino venivano fissate in formalina tamponata al 10% per la conduzione dell'esame istologico. Una porzione di rene posteriore veniva inoltre prelevata da ogni pesce per la diagnosi molecolare mediante PCR. Su tutti gli esemplari esaminati non si sono mai evidenziate lesioni anatomico-patologiche riferibili a MPR. L'esame microscopico delle impronte di rene e milza colorate con MGG e l'esame istologico non hanno evidenziato presenza di stadi extrasporogonici o sporogonici di *T. bryosalmonae* né lesioni riferibili alla malattia. Le analisi molecolari hanno permesso di evidenziare positività per *T. bryosalmonae* in 11 (4,6%) delle 238 trote selvatiche esaminate, in particolare in 4 esemplari (2 ibridi, una trota fario ed una trota marmorata) prelevati dal Basso Adige (6,8% sul totale di 59 trote campionate da questo fiume) ed in 7 esemplari (3 trote fario, 3 ibridi e 1 trota marmorata) prelevati dal Basso Isarco (11,7% sul totale di 60 trote campionate da questo fiume). Tutti i salmonidi campionati dai fiumi Passirio e Rienza sono risultati negativi. Per quanto riguarda gli allevamenti, in un solo impianto sono risultate positive 6 (42,9%) delle 14 trote fario esaminate nel mese di novembre. Il riscontro di positività solo mediante PCR potrebbe essere correlata a cariche parassitarie molto basse o ad infezioni precoci. Alla luce dei risultati ottenuti, anche in considerazione delle temperature rilevate nel corso dell'indagine, sempre <14,2°C anche in estate, nel periodo di studio non sono state evidenziate possibili correlazioni tra MPR e declino delle popolazioni di salmonidi presenti nei bacini idrografici presi in considerazione.

FAUNA PARASSITARIA DEGLI STADI GIOVANILI DI *ANGUILLA ANGUILLA* LINNAEUS, 1758 IN UN FIUME DELLA SARDEGNA NORD OCCIDENTALE (ALGHERO)

Culurgioni J.^{1*}, Diciotti R.¹, Chessa G.¹, Fois N.¹

¹Agris Sardegna - Agenzia per la Ricerca in Agricoltura. Servizio Ricerca per i Prodotti Ittici. S.S. 291 Sassari-Fertilia, Km. 18,600, località Bonassai - Olmedo. Tel. 079/2842327

L'anguilla europea *Anguilla anguilla* Linnaeus, 1758 sta andando incontro a un progressivo declino, che ha portato la Comunità Europea a mettere in atto specifiche linee guida (CE, 2007) mirate alla difesa e al recupero dello stock continentale. Nove regioni italiane, inclusa la Sardegna, hanno recepito tali direttive adottando specifici piani di gestione (RAS, 2011). Il possibile ruolo di parassiti patogeni (es. *Anguillicoloides crassus*) nel processo di declino ha determinato l'incremento di studi in materia, tuttavia sono tuttora pochi i dati pubblicati riguardanti i parassiti delle ceche e dei ragani selvatici in habitat dulciacquicoli italiani. A questo proposito, durante un monitoraggio bioecologico sulla risalita di ceche e ragani nei fiumi della Sardegna, è stata effettuata una ricerca mirata alla descrizione delle infezioni parassitarie di *A. anguilla* negli stadi precoci di colonizzazione delle acque interne.

Tra luglio 2015 e giugno 2016 sono state esaminate 26 ceche (Lunghezza Totale 5,8 – 6,8 cm; Peso 0,14 – 0,29 g), 68 ragani (LT 6,8 – 14,9; P 0,28 – 5,86), e 21 anguille gialle (LT 15,1 – 23,5; P 3,64 – 22,06), campionate mensilmente mediante bertovelli nel Rio Barca (40.606156° N; 8.341249° E), nei pressi di Alghero. In laboratorio, i pesci sono stati anestetizzati con eugenolo ed esaminati freschi o dopo congelamento a -20°C con tecniche parassitologiche standard.

In totale, 91 anguille su 118 ospitavano da una a sette specie parassite (P% = 77.1). Si è riscontrata una ricchezza di specie di metazoi di 10 (in ordine di P% totale): *Anguillicoloides crassus* nella vescica natatoria (P% = 61,0); *Pseudodactylogyrus anguillae* (P% = 43,2) e *Pseudodactylogyrus bini* (P% = 27,1) nelle branchie; cistacanti di *Southwellina hispida* nei mesenteri, *Spinitectus inermis* nello stomaco, *Bothriocephalus claviceps* nell'intestino (P% = 1,7); *Gyrodactylus anguillae* nelle branchie, *Deroprists inflata* e *Sphaerostoma bramae* nell'intestino, larve al terzo stadio di *Contracaecum rudolphii* nella cavità viscerale (P% = 0,8).

Altri tipi di infezione sono stati riscontrati nelle branchie: i mixozoi *Myxidium giardi* (P% = 21,2) e *Myxobolus* sp. (P% = 2,5), ciliati del genere *Trichodina*, Il fungo *Dermocystidium anguillae*, e una infezione "Saprolegnia-like" (P% = 1,7), quest'ultima osservata nella cloaca di un unico ospite.

Come atteso, è stata descritta una fauna elmintica tipicamente di origine dulciacquicola, essendo *D. inflata* l'unica specie di origine marino/salmastra. Nonostante la loro piccola taglia, tutti i campioni positivi ospitavano parassiti adulti specie-specifici, eccetto le larve generaliste di *S. hispida* e *C. rudolphii*, il cui ospite definitivo è il cormorano *Phalacrocorax carbo*.

Nelle ceche sono stati osservati bassi indici parassitologici: tre soli esemplari su 26 (P% = 11,5) ospitavano *A. crassus* e *Pseudodactylogyrus* spp. con IM rispettivamente di 1,7 e 1,0.

Da notare che quasi tutte le ceche positive sono state campionate in primavera, probabilmente diversi mesi dopo il loro ingresso in estuario, come suggerito dai dati biometrici (LT > 6,3 cm e P > 0,20 g). Nei ragani e nelle gialle, la maggior P% è stata registrata per *A. crassus* (rispettivamente 77,9% e 66,7%), mentre *P. bini* mostrava la più alta IM (4,5 e 12,6 rispettivamente).

Le differenze parassitologiche osservate tra le ceche e i due stadi più avanzati confermano quanto riportato nel piano di gestione (RAS, 2011), ove si suggerisce l'utilizzo di ceche piuttosto che di ragani per scopi di allevamento e di reintroduzione in natura.

References

- EC (2007). Council Regulation 1100/2007: establishing measures for the recovery of the stock of European eel. Off. J. Eur. Union, L248:17–23.
- RAS - Regione Autonoma della Sardegna - Assessorato Agricoltura e Riforma Agropastorale (2011). Piano regionale di gestione dell'anguilla. Approvato con decisione della Commissione Europea C (2011) 4816 dell'11 luglio 2011.

PRIMA SEGNALAZIONE DI *PSEUDEMPLEUROSOMA* SP. NELL'ESOFAGO DI TRIGLIE DI FANGO (*MULLUS BARBATUS BARBATUS*) E DI SCOGLIO (*MULLUS SURMULETUS*) DEL MAR MEDITERRANEO

Cipriano A.^{1*}, Caffara M.², Bottari T.³, Gaglio G.⁴, Lanteri G.⁴, Marino F.¹

¹Dipartimento di Scienze Chimiche, Biologiche, Farmaceutiche ed Ambientali, Università degli Studi di Messina; ²IDip. Di Scienze Mediche Veterinarie, Università di Bologna Alma Mater, ³IAMC del CNR di Messina; ⁴Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Messina.

Le triglie di fango (*Mullus barbatus barbatus*) e di scoglio (*Mullus surmuletus*) sono specie ittiche di importanza commerciale sempre presenti sui banconi delle peschiere o mercati. Il presente studio nasce da indagini più ampie sui parassiti delle triglie ancora in corso ed ha l'obiettivo di segnalare per la prima volta la presenza di un trematode monogeneo a localizzazione esofagea in triglie di fango e di scoglio. In totale sono stati analizzati 38 esemplari, 10 pescati nello Stretto di Messina e 28 nelle acque che circondano l'isola di Lampedusa (zona FAO 38.2.2). I pesci sono stati sottoposti ad esame necroscopico; l'esofago è stato isolato per successive indagini allo stereomicroscopio ed i parassiti reperiti sono stati processati per le indagini morfometriche al microscopio ottico ed elettronico a scansione. Successivamente gli esofagi sono stati fissati in formalina e sottoposti ad indagini istopatologiche di routine. Quattro parassiti sono stati fissati in alcool 70 ° per le successive indagini molecolari. Il DNA è stato estratto mediante un kit del commercio e sottoposto ad amplificazione del gene COX1 mtDNA seguita da sequenziamento e successiva ricerca di similarità mediante BLAST. Dei 38 esemplari di triglia analizzati 19 (P=50%), tutti provenienti da Lampedusa, erano parassitati da alcuni trematodi monogenei adesi alla mucosa esofagea. Le indagini morfometriche hanno permesso di classificare il trematode come appartenente al "*Diplectanotrema group*", dall'insolita localizzazione esofagea. Il suddetto distretto infatti è spesso poco considerato, in quanto breve e di difficile visualizzazione; inoltre i monogenei sono generalmente considerati ectoparassiti, sebbene alcuni di essi si siano adattati ad un'esistenza endoparassitaria. In particolare il trematode reperito appartiene al genere *Pseudempleurosoma*. È stata rilevata un'abbondanza media di 1,05 e un'intensità media pari a 2,1. Le sezioni istologiche hanno infine mostrato il parassita agganciato fino alla parte più profonda della mucosa, al limite della sotto mucosa, invocando in quest'ultima un'iperemia causata dal corrispettivo organo di aggancio. L'analisi delle sequenze non ci ha permesso di raggiungere una identificazione di specie, in quanto nessuna sequenza comparabile è disponibile in banche dati. I risultati della presente indagine, confrontati con gli esigui lavori di ricerca attinenti, hanno evidenziato disuguaglianze morfometriche e biologiche con le specie già note appartenenti al genere *Pseudempleurosoma*, è quindi possibile ipotizzare che presumibilmente si tratti di una nuova specie. Le informazioni ottenute sul parassita oggetto di studio, lo inquadrano in un nuovo *range* di distribuzione geografica, quale il Mar Mediterraneo e in nuovi organismi. Tutte le specie riconducibili al genere *Pseudempleurosoma* non sono infatti state riportate nelle triglie e inoltre esclusivamente nelle acque delle Hawaii, Cuba e Brasile. In dettaglio le specie di *Pseudempleurosoma* conosciute, sono state documentate in *Caranx lugubris*, *Caranx sexfasciatus* e *Myripristis berndti*, *Caranx ruber*, *Myripristis jacobus*, *Paralonchurus brasiliensis*, *Trichiurus lepturus* e *Thyrstitops lepidopoides*, ciò rende particolarmente interessante la ricerca condotta che esplorando un campo in continuo aggiornamento e tenendo in considerazione la specificità dei trematodi monogenei, adattati a peculiari siti, ospiti e macro ambienti, si pone l'obiettivo di ampliare lo studio eseguito, al fine di avere informazioni aggiuntive sull'identificazione di specie, sulla localizzazione e sulle peculiarità del parassita documentato e di acquisire infine nuovi dati che possano presumibilmente essere relazionati all'appartenenza della popolazione ospite a specifici *stock* ittici.

IMPORTAZIONE DI PESCI ORNAMENTALI D'ACQUA DOLCE: RISCHIO D'INTRODUZIONE DI PATOGENI?

Bona M.C.^{1*}, Righetti M.², Burioli E.A.V.², Barisone S.², Dellerba D.², Maurella C.¹, Scanzio T.², Ru G.¹, Prearo M.²

¹BEAR BioStatistica, Epidemiologia e Analisi del Rischio; ²Laboratorio Specialistico di Ittiopatologia – Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta – Torino

Si stima che oltre 1 miliardo di pesci ornamentali, che comprendono più di 4.000 specie di acqua dolce e 1.400 specie marine provenienti da oltre 100 paesi, sono commercializzati ogni anno nel mondo. L'hobby dell'acquariofilia rappresenta un'industria che fattura complessivamente molti milioni di euro; nel 2000 il valore all'ingrosso globale del commercio di pesci ornamentali è stato stimato dalla FAO in 900 milioni di dollari, per un valore al dettaglio di circa 3 miliardi di dollari. In Europa lo scorso anno, secondo il rapporto OATA 2015, il valore totale delle importazioni di pesci ornamentali è stato pari a 78,2 milioni di euro ed in particolare le specie d'acqua dolce hanno rappresentato l'82,1% del valore totale delle importazioni, mentre le specie marine il restante 17,9%. Quasi l'80% dei pesci ornamentali d'importazione proviene dal Sud-est asiatico. Le prime cinque nazioni esportatrici sono Singapore, Thailandia, Filippine, Hong Kong e Indonesia. Il Sud America (Colombia, Brasile e Perù) è la seconda regione di provenienza dei pesci ed esporta per il 14% del mercato. Il resto dei pesci ornamentali d'importazione proviene dalle restanti regioni del mondo. Si tratta di un'attività caratterizzata dall'aggregazione nei mercati all'ingrosso, in particolare Singapore e Hong Kong, di numerose specie di pesci provenienti da più paesi di origine per l'esportazione verso gli Stati Uniti, che rappresentano il mercato più importante, l'Europa e il Giappone.

La diffusione “transfrontaliera” di malattie infettive è facilitata dal commercio di animali vivi; è riconosciuto che l'importazione di animali e prodotti di origine animale comporta sempre un certo livello di rischio di introduzione di agenti eziologici. In effetti la minaccia di introduzione di nuove patologie causata dal commercio internazionale di pesci ornamentali è ben e sono stati sviluppati codici di condotta e norme, quali la Direttiva Europea 2003/858/CE e la decisione UE del 20 settembre 2006 (2006/656/CE) che fissano le condizioni di polizia sanitaria e di certificazione veterinaria per le importazioni di pesci per scopi ornamentali.

Tra gli esempi di diffusione “transfrontaliera”, risale agli anni '90 la recensione di un grande numero di parassiti nel Regno Unito con l'importazione pesci ornamentali ed il riscontro in Europa della specie ittica *Pseudorasbora parva*, introdotta accidentalmente dall'Asia con le importazioni di carpe (*Cyprinus carpio*) a scopo ornamentale. Al di fuori del continente europeo, il commercio di pesci ornamentali è stato associato all'introduzione di Iridovirus in Australia.

Secondo i dati Eurispes, raccolti nel Rapporto Italia 2016, nelle nostre case vivono circa 60 milioni di animali domestici e di questi, trenta milioni, tra esemplari più o meno esotici, vivono nei nostri acquari. Un aspetto da non trascurare è quindi il rischio sanitario legato all'importazione di specie ittiche esotiche ed al loro allevamento in qualità di specie ornamentali.

Scopo del nostro lavoro è valutare la probabilità di ingresso e di diffusione di un agente eziologico quale virus, batterio o parassita nel territorio del nostro Paese, attraverso le importazioni di specie ornamentali d'acqua dolce. La valutazione del rischio, così come definito dal CODEX e dall'OIE è il processo di stima della probabilità che una popolazione o parte di essa sia esposta a un pericolo (Hazards) e dell'entità del danno che ne consegue.

Si tratta di un processo costituito da più fasi ben definite, che origina con l'individuazione del pericolo, nel nostro caso l'identificazione degli agenti patogeni che potrebbero essere responsabili dell'ingresso e diffusione di nuove patologie.

UTILIZZO DI DOCTOR FISH NEI CENTRI ESTETICI: PRIME VALUTAZIONI SU LINEE GUIDA NEL RISPETTO DEL WELFARE E DELLA SANITA' PUBBLICA

Prearo M.¹, Righetti M.^{1*}, Bona M.C.², Pastorino P.¹, Fogliani C.¹, Briata M.P.³, Ru G.², Pennazio R.³

¹Laboratorio Specialistico di Ittiopatologia; ²BEAR BioStatistica, Epidemiologia e Analisi del Rischio – Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino; ³ASL 2 Savonese, Savona

Garra rufa è un piccolo ciprinide che vive nelle acque dolci e nei bacini idrografici dell'Eurasia. Si nutre prevalentemente di fitoplancton e detriti animali. L'utilizzo di *Garra rufa* nel trattamento terapeutico della psoriasi è oramai da tempo conosciuto e l'interessamento del mondo scientifico ha portato ad apprendere tutti gli effetti benefici dell'ittioterapia. Anche l'utilizzo dei *doctor fish* a fini estetici (*fish pedicure*) è oramai una pratica consolidata, soprattutto in alcuni paesi ad elevata vocazione turistica, ma in questo caso non si conoscono con esattezza le misure di biosicurezza da perseguire per mantenere basso il rischio sanitario. L'utilizzo di animali vivi in questi tipi di trattamenti, la possibile immersione di molti avventori nella medesima vasca, la possibilità di controllo relativamente blanda sullo stato di salute della clientela, la difficoltà di effettuare pratiche di disinfezioni molto spinte, portano ad un probabile aumento del rischio di poter contrarre problematiche sanitarie con l'uso inappropriato di queste pratiche estetiche. Se teniamo conto poi che la legislazione verso questo argomento è totalmente carente e lasciata alla buona volontà delle autorità locali, spesso senza esigere nessun tipo di controllo sanitario, il rischio può diventare enormemente pericoloso. Proprio per cominciare a creare una base su cui le autorità sanitarie che devono gestire questa problematica possano governare la problematica con autorevolezza, è necessario fornire dei dati che siano di supporto a potenziali linee guida condivise da tutti gli *stakeholders*, in modo da fornire delle azioni chiare, sia da parte dei gestori dell'attività, che da parte dei controllori. Le linee guida che sono state qui predisposte per la gestione e la verifica delle attività di *fish pedicure*, rappresentano un concentrato di nozioni scientifiche attualmente presenti sull'argomento, oltre che la sintesi critica delle azioni previste nelle linee guida al momento in vigore nel Regno Unito (Health Protection Agency, 2011) e in Francia (ANSES, 2012), l'inserimento di alcuni parametri richiesti per categorie di attività analoghe e azioni che allo stato attuale delle conoscenze, a nostro avviso sono utili per accertare il reale rischio di queste attività. Queste linee guida, che verranno redatte in fase definitiva al termine della sperimentazione in corso, nel 2017, dovranno essere la base per fornire informazioni utili sia sullo stato sanitario dei pesci, compreso il loro benessere, sia sulle misure di biosicurezza da attuare per diminuire i potenziali rischi di sanità pubblica, sia munire gli operatori addetti al controllo di uno strumento valido, utile ed efficace nella gestione delle criticità e del rischio effettivo di tale pratica. Alla base di tutto deve esserci l'identificazione univoca delle partite dei pesci presenti e la loro sicura determinazione genetica, per poter predisporre tutte le successive azioni con controlli adeguati. Lo stato sanitario dei pesci deve essere valutato in autocontrollo dai gestori dell'attività, con cadenze prestabilite in base al proprio *turn-over*, in accordo con le autorità locali e verificato con cadenza ciclica mediante visione dei registri e analisi periodiche. La gestione delle misure di biosicurezza risulta altresì importante, sia in autocontrollo che in verifica, per la successiva valutazione dei parametri microbiologici ambientali; oltre a quelli comunemente identificati, quali la ricerca della carica batterica mesofila, la ricerca di *Escherichia coli* β-glucuronidasi, di *Salmonella* spp., di *Listeria monocytogenes*, di *Vibrio cholerae* e *V. parahaemolyticus*, di *Staphylococcus* spp. e *S. aureus*, dei virus dell'Epatite A e dell'epatite E, di Norovirus, è importante verificare anche la presenza di possibili parassiti come *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp., veicolabili dal pesce e dall'acqua e di batteri comunemente presenti nell'acqua e nel biofilm come *Pseudomonas aeruginosa* e *Legionella* spp. Atro caposaldo nella gestione del rischio è un'adeguata formazione, sia del personale adibito alle attività estetiche che prevedono l'utilizzo di *fish doctor*, sia degli operatori sanitari adibiti ai controlli sanitari; tale attività deve essere prevista in modo opportuno e continuo per minimizzare i rischi dovuti alla mancanza di consapevolezza delle problematiche che possono insorgere. La redazione definitiva di queste linee guida porterà una nuova *governance* di queste attività, sia dal punto di vista gestionale, per un miglioramento del servizio al pubblico, sia dal punto di vista autorizzativo ed ispettivo per una gestione e una maggiore sicurezza di tale attività. Prospettiva successiva sarà quella di estendere l'utilizzo di tali linee di condotta dal livello locale al livello nazionale.

IL FENOMENO DELLA COSI' DETTA SPINA BIFIDA NEL TONNETTO ALLETTERATO (*E. ALLETTERATUS*, *Rafinesque 1810*). UN MITO SFATATO

De Benedetto G.^{1*}, Marino F.², Macrì F.¹, Salvo A.³, Puleio R.⁴, Bellantone F.⁵, Arcangeli G.⁶

¹Dip. di Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Messina; ²Dip. di Scienze Chimiche, Biologiche, Farmaceutiche ed Ambientali, Università degli Studi di Messina; ³Dip. di Scienze biomediche, odontoiatriche e delle immagini morfologiche e funzionali, Sez. SASTAS; ⁴IZS Sicilia; ⁵ASP 5 Reggio Calabria, Distretto Villa S. Giovanni; ⁶IZSVE, Centro di Referenza Nazionale per lo studio e la diagnosi delle malattie dei pesci, molluschi e crostacei

Dal 2014, numerosi forum specializzati nel settore pesca sportiva, quotidiani on line e qualche programma televisivo hanno trattato il fenomeno “spina bifida” nei pesci. Particolare rilievo hanno assunto le sempre più frequenti segnalazioni riguardanti una presunta deformazione assiale a carico della colonna vertebrale dei tonnetti alletterati (*Euthynnus alletteratus*) “etichettata” erroneamente come “spina bifida”. Qualche esperto del settore contattato, sulle basi di analisi tossicologiche effettuate presso laboratori privati ha dichiarato che tutto ciò fosse imputabile all’effetto teratogeno, mutageno e cancerogeno di alcune classi di inquinanti ambientali, in grado di bioaccumularsi nei tessuti organici, nella fattispecie i PCB e gli IPA. Visto il sempre crescente allarmismo dei consumatori nei confronti di questa specie si è deciso di studiare la colonna vertebrale di *E. alletteratus* dal punto di vista anatomo-istopatologico, radiologico e tossicologico. Alla necropsopia preceduta dalla radiografia non si apprezzavano alterazioni riconducibili a processi patologici in atto, in alcuni esemplari si riscontrava la presenza di Nematodi (*Anisakis spp.*). L’architettura tridimensionale della colonna vertebrale è legata alla specifica funzione data dai processi emali della stessa, i quali, fondendosi ventralmente andavano a costituire una doccia parallela alla colonna, atta ad accogliere la rete mirabile dell’organo termogenico, struttura caratteristica di specie, data da una serie di anastomosi artero-venose che, con un meccanismo in controcorrente riscaldano il sangue arterioso destinato alla muscolatura a fibra rossa, contribuendo positivamente a migliorare il nuoto rendendolo più performante. I preparati istologici hanno messo in evidenza chiaramente la presenza dell’organo termogenico, posto in posizione centrale tra i processi emali e circondato da parenchima renale, il quale in questa specie risulta leggermente spostato ventralmente verso la cavità celomatica. L’esame tossicologico ha evidenziato valori di poco superiori ai limiti di legge esclusivamente per quanto riguarda Σ DDT e TEQ-PCB-DL, mentre risultavano aumentati i valori di Cd e Pb per i metalli pesanti, nella norma tutti gli altri inquinanti e metalli ricercati; all’esame SEM-EDS per la ricerca di metalli su campioni di colonna non si riscontrava presenza di elementi estranei a quelli coinvolti nella normale costituzione del tessuto osseo. Su queste basi crediamo che, nonostante valori lievemente superiori ai limiti di legge per quanto riguarda alcuni inquinanti ambientali e metalli pesanti, tale condizione fisiologica non risulta legata alla presenza di agenti mutageni e teratogeni; anche se questa specie, molto soggetta a bioaccumulo in quanto in cima alla catena trofica, può mostrare alti livelli residui nei tessuti, al punto di essere utilizzata come biomarker. Lo studio non ha inoltre rilevato alcuna nuova e supplementare contaminazione nei teleostei esaminati. Infine, in pieno accordo con la letteratura possiamo affermare che la conoscenza della morfologia peculiare di ogni singola specie ittica è elemento imprescindibile per l’individuazione di condizioni patologiche; le anomalie congenite interessano percentuali infinitesimali di una popolazione ittica, di contro, tutti i tonnetti presentavano la stessa struttura fisiologica della colonna, inoltre, la tecnica di pesca utilizzata per i campionamenti cioè la traina costiera alla velocità di 5Kts e lo stato di salute dei soggetti esaminati ci porta ad affermare che non solo non sono defedati da patologie assiali della colonna vertebrale bensì risultano essere i più forti e sani dell’intero stock.

VALUTAZIONE DELLA EVENTUALE TOSSICITA' *IN VIVO* DI NANOPARTICELLE DI ARGENTO IN ESEMPLARI ADULTI DI *DANIO RERIO*

Capparucci F.^{1*}, Di Caro G.³, Marino F.¹, Brundo M.V.², Salvo A.⁴, Rotondo A.⁴, Macri B.³, Pecoraro R.², D'Amante G.², Zimbone M.⁵

¹Dipartimento di Scienze Chimiche, Biologiche, Farmaceutiche ed Ambientali, Università di Messina; ²Dipartimento di Scienze Biologiche, Geologiche e Ambientali, Università di Catania; ³Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università di Messina; ⁴Dipartimento di Scienze biomediche, odontoiatriche e delle immagini morfologiche e funzionali, Università di Messina; ⁵CNR IMM, Catania

Oggi giorno l'utilizzo sempre crescente di nanoparticelle di argento, ha posto un importante interrogativo sulla loro eventuale tossicità sulla salute umana e le conseguenze dal punto di vista ambientale. Le nanoparticelle di argento (AgNP) infatti, sono tra i nanomateriali più utilizzati con proprietà antibatteriche, le quali presentano una elevata reattività chimica a causa del loro grande rapporto superficie/volume. Questo tipo di materiale, per le sue proprietà antimicrobiche, può essere applicato in diversi ambiti industriali, tessile e prodotti commerciali e diverse applicazioni in ambito medico. Nel presente lavoro è stato studiato l'effetto delle nanoparticelle di argento in esemplari adulti di *Danio rerio*. Le NP sono state realizzate con la tecnica del Laser Ablation in Liquid, un processo fisico che prevede l'utilizzo brevi impulsi di energia laser su un substrato immerso in un solvente. Le nanoparticelle così prodotte hanno il vantaggio di essere pure al 100%, ma avendo una certa carica superficiale tendono ad agglomerarsi nel tempo. L'esame al SEM rivela la caratteristica forma sferica ed un diametro di circa 25 nm. I soggetti, escluso il gruppo di controllo, sono stati esposti a 3 concentrazioni crescenti di AgNP (8,45 e 70 µg/L) per un periodo consecutivo di 30 giorni, al termine dei quali è stata effettuata l'eutanasia con MS-222 nella dose di 0,7 mg/L. Giornalmente, le tre soluzioni sono state ricreate ex novo a partire dalla soluzione madre e sonicate per mezzo di un sonicatore al fine di separare e mettere in sospensione le particelle che normalmente tendono ad aggregarsi. Tali procedure sono state effettuate sotto cappa aspirante per questioni di sicurezza. Gli zebrafish sono stati sottoposti ad analisi spettrometriche con ICP-MS, istologiche e immunoistochimiche. Dai risultati ottenuti con ICP-MS si evince che le nanoparticelle sono state assorbite da tutti e tre i gruppi sottoposti alla sperimentazione. L'esame istologico ha evidenziato che i tessuti maggiormente colpiti sono branchie ed intestino, strettamente a contatto con il mezzo acquoso e con funzione di scambi osmotici. Le branchie hanno riportato lesioni con diversi gradi di tossicità a carico delle lamelle secondarie come iperplasia, fusione lamellare, edema sub epiteliale e in alcuni casi teleangectasia. A livello intestinale invece si riscontrava prevalentemente necrosi a carico dei villi intestinali. Tutti gli altri tessuti, rene, fegato, milza, cuore e gonadi erano privi di lesioni patologiche. Contestualmente, è stata effettuato l'esame immunoistochimico per evidenziare la presenza delle metallotioneine. Utilizzando specifici anticorpi di mouse anti-MT, il tessuto intestinale dei soggetti trattati, ha evidenziato una forte espressione di queste proteine in raffronto con il gruppo di controllo. Dai risultati ottenuti con ICP-MS abbiamo riscontrato un assorbimento pressoché simile dovuto al fatto che maggiore è la concentrazione delle nanoparticelle, maggiore è la possibilità di aggregazione il che diminuisce la loro disponibilità per l'assorbimento. Inoltre l'esame istologico conferma quanto ottenuto con l'icp-ms. Le lesioni più gravi infatti sono state riscontrate nei gruppi esposti a minore concentrazione perché più monodisperse e assimilabili. Infine, l'esame immunoistochimico conferma che branchie e intestino sono le principali vie di assorbimento e organi bersaglio delle nanoparticelle. In conclusione possiamo affermare che la tossicità delle nanoparticelle di argento, non è strettamente legata alla loro concentrazione, ma piuttosto alla loro dimensione e grado di dispersione/aggregazione. Le nanoparticelle di argento disperse in acqua sono in grado di attraversare le barriere mucosali e di evocare danno a carico di branchie e intestino. Il danno risulta comunque reversibile in quanto, in nessun caso si è documentata una lesione alle membrane basali. Ulteriori indagini quali ultrastruttura ed espressione genica sono attualmente in corso per confermare i risultati ottenuti.

LE MORTALITA' ANOMALE DI ITTIOFAUNA: UN SERIO PROBLEMA DA AFFRONTARE CON RIGORE

Pastorino P.^{1*}, Bona M.C.², Fogliani C.¹, Burioli E.A.V.¹, Scanzio T.¹, Marra A.², Maurella C.², Desiato R.², Ru G.², Prearo M.¹

¹Laboratorio Specialistico di Ittiopatologia; ²BEAR BioStatistica, Epidemiologia e Analisi del Rischio – Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta – Torino

Le mortalità anomale di ittiofauna in acque libere possono essere provocate da diverse cause: ambientali, chimiche e antropico-industriali. Tra queste, quelle di natura ambientale, spesso sono le più frequenti, giustificate soprattutto nel periodo estivo, in cui l'innalzamento della temperatura, la scarsa idrodinamicità dell'acqua (dovuta ad eventi di magra dei sistemi fluviali) e la produzione di cianotossine per un'eccessiva proliferazione algale, causano la morte improvvisa di una popolazione o di una comunità ittica in un arco di tempo estremamente breve. La gestione delle mortalità anomale appare difficoltosa e problematica, sia per il rapido effetto diluizione che si viene a creare subito dopo l'evento, sia per la veloce deperibilità delle specie ittiche in acqua. Appare quindi indispensabile creare un coordinamento tra i possibili attori delle Pubbliche Amministrazioni in modo da rendere efficaci e tempestive le azioni.

Fino ad ora, la Regione Toscana è stata l'unica realtà sul territorio nazionale che ha adottato, tramite Decreto Dirigenziale n. 6481 del 2009, delle linee guida regionali per le modalità di intervento e gestione di questa problematica. Sulla scia di questa, anche l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta ha proposto un protocollo d'intesa, con l'obiettivo di fornire le indicazioni operative d'intervento in caso di mortalità anomale di ittiofauna in acque libere all'interno del territorio delle tre Regioni di competenza.

Gli obiettivi del protocollo di intesa prevedono: 1) - il coordinamento e l'armonizzazione degli enti coinvolti nella gestione delle emergenze sul territorio regionale; 2) - l'integrazione delle modalità operative, sul territorio e nei laboratori, che consentirebbe di ottenere lo scambio di dati confrontabili, evitandone la dispersione; 3) - la creazione di una banca dati e di una mappa regionale delle aree coinvolte.

Il protocollo, che prevede il coinvolgimento di diversi enti pubblici con competenze in vari ambiti, prevede i seguenti punti: a) - la segnalazione della mortalità anomala e l'effettuazione di un sopralluogo preliminare ad opera del Corpo Forestale dello Stato o di altro ente preposto; b) - in caso di esito positivo, la richiesta di un nuovo sopralluogo congiunto con gli altri enti coinvolti, al fine di identificare le specie ittiche, prelevare campioni, raccogliere dati utili alla quantificazione del fenomeno, rimuovere e smaltire le eventuali carcasse presenti.

Gioca un ruolo decisivo l'istituzione degli Istituti Zooprofilattici Sperimentali di competenza territoriale in quanto, oltre a fungere da organi preposti alle analisi, devono svolgere un'azione di coordinamento e di informatizzazione dei dati mediante l'osservatorio epidemiologico, per gestire al meglio la casistica e fornire alle Amministrazioni locali i dati relativi a tali eventi.

In un'ottica di gestione integrata è quindi indispensabile che tutti i soggetti interessati operino in modo coordinato, condividendo obiettivi e risultati ed evitando azioni scollegate che spesso hanno, come unica conseguenza, uno spreco di energie e di risorse umane ed economiche, senza arrivare ad una determinazione della causa. La prontezza d'intervento, il prelievo corretto e oculato dei campioni e la trasmissione di informazioni strategiche, potrebbero infatti essere i punti chiave per l'individuazione dei fattori scatenanti gli episodi di mortalità anomala per affrontare efficacemente eventuali emergenze future.

Il passo successivo sarà quello di effettuare un'opera di divulgazione e informazione alla popolazione residente nei pressi di fiumi o laghi ed ai fruitori di questi ambienti sull'importanza di allertare le autorità competenti per poter agire con tempestività e per ottenere maggiori risultati sulla tutela della fauna ittica, un bene comune che deve essere preservato nel miglior modo possibile.

ANALISI DEI FATTORI DI RISCHIO DI INTRODUZIONE DELLA SEV NEGLI ALLEVAMENTI DI TROTE DELLA PROVINCIA AUTONOMA DI TRENTO

Ceolin C.^{1*}, Toson M.¹, Bille L.¹, Toffan A.¹, Quartesan R.¹, Casarotto C.¹, Bortolotti L.², Gatti F.², Piacini A.², Dalla Pozza M.¹

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie; ²Azienda Provinciale per i Servizi Sanitari di Trento

La Provincia Autonoma di Trento (PATN) è uno dei territori italiani maggiormente vocati all'allevamento delle specie ittiche d'acqua dolce. Considerata la rilevanza economica del settore dell'acquacoltura, da più di vent'anni in tale Provincia sono attivi programmi di monitoraggio finalizzati all'eradicazione di talune malattie virali delle trote, tra cui la Setticemia Emorragica Virale (SEV). Nonostante l'applicazione delle strategie di stamping out e vuoto sanitario previste dal Dlgs 148/2008 a seguito di positività per SEV, nel territorio sono ancora presenti aziende positive. Le trotecolture presenti nella PATN nel 2015 erano 69, di cui 11 infette per SEV. L'obiettivo del presente lavoro è stato quello di analizzare i possibili fattori di rischio di introduzione di SEV negli allevamenti della PATN dal 2010 al 2015. Le informazioni contenute nelle schede per la richiesta di autorizzazione da parte delle aziende ai sensi del Dlgs 148/08 e nelle schede per la determinazione del livello di rischio sono state unite ai risultati delle attività di monitoraggio eseguite nei confronti di SEV nel periodo di studio. E' stato così creato un database e sono stati analizzati i seguenti dati: indirizzo produttivo (aziende con riproduttori, con incubatoi-vivaio ed aziende da ingrasso per consumo umano), tipologia di approvvigionamento idrico (corso d'acqua, pozzo o sorgiva), stato sanitario delle aziende da cui viene acquistato pesce e i risultati delle analisi di laboratorio per la ricerca del virus SEV. Sono state inoltre inserite informazioni di tipo geografico per ogni azienda tra cui: posizione geografica, numero e stato sanitario degli allevamenti presenti nel raggio di 5 km, la distanza dal più vicino allevamento positivo per SEV e numero di allevamenti presenti lungo il corso d'acqua entro i 5 km a monte e a valle. E' stata eseguita un'analisi preliminare mettendo in associazione le variabili di cui sopra con lo stato sanitario per SEV (positivo/negativo all'isolamento virale) di ciascun allevamento nel periodo considerato. Per le variabili categoriali (indirizzo produttivo, approvvigionamento idrico) è stato usato il test chi-quadro di Pearson, mentre per le variabili quantitative (numero degli allevamenti nel raggio di 5 km, distanza dal più vicino allevamento positivo per SEV) il test di Wilcoxon (Mann-Whitney) per due campioni indipendenti. Successivamente è stata effettuata un'analisi di regressione logistica multivariata su dati longitudinali in cui è stato valutato l'effetto simultaneo di tutte le variabili sulla probabilità di essere infetto per SEV in ognuno degli anni considerati. Dalla prima analisi emerge che c'è associazione significativa fra l'essere infetti per SEV ed avere come indirizzo produttivo "ingrasso per consumo umano" (P=0.004), avere aziende a monte di categoria sanitaria non "indenne" (P=0.00), acquistare da aziende non indenni (P=0.00), avere almeno un allevamento infetto nel raggio di 5 km (P=0.00) e avere attività di ripopolamento a monte dell'azienda di specie sensibili provenienti da aziende non indenni (P=0.002). Tali associazioni sono state sostanzialmente confermate dall'analisi multivariata, che ha evidenziato una probabilità più alta di essere infetto per SEV negli allevamenti con indirizzo produttivo "ingrasso per consumo umano" (OR=11.5; IC95%: 2.3-58.1), che hanno a monte allevamenti non indenni (OR=5.7; IC95%: 2.0-16.0), che acquistano da aziende non indenni (OR=7.2; IC95%: 2.1-24.7) e che hanno almeno un allevamento positivo per SEV nel raggio di 5 km (OR=39.7; IC95%: 8.4-188.0). Questo studio conferma quanto riportato in letteratura¹⁻² e cioè che tra i fattori di rischio più importanti associati alla diffusione di SEV vi sono, oltre allo stato sanitario delle aziende limitrofe e la vicinanza ad allevamenti positivi, le movimentazioni di animali vivi tra allevamenti, che sono verosimilmente più numerose negli allevamenti da ingrasso. Per un futuro approfondimento di tale rilievo, sarebbe necessario avere a disposizione tutti i dati relativi al numero e all'origine delle singole partite introdotte nei diversi allevamenti.

- (1) Bang Jensen, B., Ersbøll, A.K., Korsholm, H., Skall, H.F., and Olesen, N.J. (2014). Spatio-temporal risk factors for viral haemorrhagic septicaemia (VHS) in Danish aquaculture. *Dis. Aquat. Organ.* 109, 87-97.
- (2) Oidtmann, B.C., Crane, C.N., Thrush, M.A., Hill, B.J., and Peeler, E.J. (2011). Ranking freshwater fish farms for the risk of pathogen introduction and spread. *Prev Vet Med.* 102, 329-340

PROPOSTA DI METODI ALTERNATIVI DI ERADICAZIONE DI SEV E NEI NELLA PROVINCIA AUTONOMA DI TRENTO

Gatti F.^{1*}, Bortolotti L.¹, Piacini A.¹, Bille L.², Manfrin A.², Dalla Pozza M.², Fasoli F.¹

¹ Azienda Provinciale per i Servizi Sanitari di Trento; ² Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie

L'acquacoltura è un settore molto importante per l'economia del Trentino (seconda produzione lorda vendibile del comparto zootecnico) e in particolare delle Valli Giudicarie dove sono presenti circa 30 impianti attivi, in cui si producono prevalentemente trote iridee da consumo, ma anche salmerini, trote fario e marmorate da ripopolamento. Rilevante è anche la produzione di uova e materiale da semina che trovano apprezzamento e collocazione anche sui mercati esteri. Tutto questo è stato reso possibile, oltre che dalle caratteristiche di un territorio particolarmente favorevole, dalla lungimiranza di tutti gli operatori del settore. Stakeholders e servizi sanitari hanno infatti saputo guardare lontano, proponendo e finanziando piani di eradicazione delle principali malattie virali che colpiscono i salmonidi (SEV e NEI) che causano forti perdite negli allevamenti e ripercussioni sulla libera commercializzazione del prodotto. Nella Provincia autonoma di Trento è stato adottato un piano di controllo e successivamente di eradicazione per SEV e NEI già a partire dagli anni '70. Il territorio provinciale è stato suddiviso in 21 zone corrispondenti ad altrettanti bacini idrografici, 15 delle quali, nel corso degli anni, sono state riconosciute indenni. I piani provinciali di eradicazione summenzionati si sono dimostrati una formidabile arma per conquistare mercati prestigiosi e garantire ai trotilcoltori una redditività aziendale di "grande soddisfazione". Tuttavia la reinfezione degli allevamenti che talvolta si verifica, può vanificare i risultati raggiunti a fronte di grandi sacrifici. Le necessarie operazioni di svuotamento e disinfezione, il fermo/impianto, la reimmissione di materiale indenne, il lungo ciclo di accrescimento per giungere a porzione commerciale e i lunghi tempi necessari per la riacquisizione dello status di indennità, di fatto sono economicamente molto gravosi e possono scoraggiare gli interventi di risanamento.

In tale contesto si rende necessario individuare, proporre e sperimentare soluzioni alternative a garanzia del patrimonio animale e dello sviluppo economico delle Comunità in cui si opera. Grazie al dialogo e alla condivisione delle esperienze maturate fra gli esperti del settore acquacoltura della APSS, i ricercatori dell'I.Z.S. delle Venezie, dell'Università di Padova e, non per ultimi, gli stessi allevatori, è nato un approccio alternativo finalizzato appunto alla eradicazione di SEV e NEI attraverso un intervento di "svuotamento per settori" (o a step) dell'impianto, con una riduzione al minimo dell'impatto economico. Tale procedura è stata adottata dall'amministrazione della Provincia Autonoma di Trento con il provvedimento D.P.G.P. N. 740/2014, che stabilisce che possa essere utilizzata in quelle aziende in cui lo svuotamento dell'impianto con vuoto sanitario non sia praticabile e laddove le condizioni logistiche e gestionali dell'allevamento lo permettano. Questa procedura alternativa si basa sullo svuotamento delle vasche secondo la logica che le prime vasche che devono essere disinfettate sono quelle in testa all'impianto, contigue all'entrata dell'acqua ed a seguire tutte le altre. Il piano di azione, presentato dal responsabile dell'impresa di acquacoltura all'Unità operativa di Igiene e sanità pubblica veterinaria (APSS) competente per territorio, deve evidenziare: 1) i tempi, le modalità di svuotamento e disinfezione e gli ostacoli che impediscono al pesce di entrare nelle vasche sottoposte a risanamento; 2) le buone pratiche di allevamento e tutte le procedure di biosicurezza da attuare al fine di assicurare la non diffusione dell'agente di malattia dalle vasche non ancora svuotate a quelle svuotate e disinfettate; 3) i tempi e le modalità con cui il materiale ittico sarà testato dal punto di vista virologico durante le varie fasi di eradicazione; 4) le modalità attraverso le quali l'APSS dichiarerà la conclusione della procedura e dichiarerà estinto il focolaio di malattia. Il piano deve essere valutato dall'APSS che ne autorizzerà la realizzazione previa acquisizione del parere del Centro di riferimento per le malattie dei pesci, molluschi e crostacei. Ad ulteriore sostegno o in alternativa al metodo di eradicazione a step è stato inoltre suggerito uno studio sulla possibilità di allevamento, durante il periodo di vuoto sanitario, di altre specie ittiche di elevato pregio commerciale, quali ad esempio il pesce persico reale (*Perca fluviatilis*) e/o il carpione del Garda (*Salmo carpio*), rispetto alle quali è stata dimostrata l'assenza di sensibilità ai virus responsabili della SEV/NEI.

RESISTENZA DEL CARPIONE (*SALMO CARPIO*) AL VIRUS DELLA NECROSI EMATOPOIETICA INFETTIVA IN PROVE DI COABITAZIONE CON TROTE IRIDEE (*ONCORHYNCHUS MYKISS*) CLINICAMENTE INFETTE

Manfrin A.^{1*}, Toffan A.², Quartesan R.², Fiocchi E.¹, Bortolotti L.³, Gatti F.³, Piacini A.³, Lunelli F.⁴

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, CSI Adria (RO); ² Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro (PD); ³ Azienda Provinciale Servizi Sanitari Trento; ⁴ Fondazione Edmund Mach, San Michele all'Adige (TN)

Il carpione, *Salmo carpio*, è un salmonide originario del Lago di Garda che negli ultimi anni è stato riprodotto artificialmente dai ricercatori del Centro Ittico Sperimentale della Fondazione Edmund Mach di San Michele all'Adige (TN) e che si sta dimostrando una specie estremamente interessante da un punto di vista commerciale. Nonostante i tempi di crescita abbastanza lunghi, infatti, la qualità delle sue carni rende questa specie molto interessante per i trotaicoltori, alcuni dei quali stanno effettuando delle prove di allevamento direttamente presso i propri impianti situati nella Provincia di Trento. Per quanto riguarda invece la suscettibilità alle classiche malattie virali dei salmonidi, al momento non esistono in bibliografia dati scientifici. In passato è stata effettuata una sola prova sperimentale di infezione con i virus della setticemia emorragica virale (SEV) e della necrosi ematopoietica infettiva (NEI) presso l'acquario del Centro di Referenza Nazionale di Legnaro, ma l'esiguo numero di animali testati non ha consentito di confermare od escludere la resistenza di questa specie alle due malattie. Durante i primi mesi del 2016, approfittando di un focolaio di NEI in trote iridee di un impianto trentino, in accordo con i servizi veterinari della Provincia, è stata predisposta una prova di infezione tramite coabitazione, posizionando tre gabbie in prossimità delle griglie di scarico di altrettante vasche contenenti trote iridee con episodio clinico di NEI in atto e temperatura dell'acqua di 8°C. Ciascuna gabbia conteneva 100 carpioni di circa 10 g, di un anno di età, precedentemente risultati negativi all'esame virologico per SEV e NEI. Al momento dell'introduzione dei carpioni, invece, le trote iridee manifestavano segni clinici tipici di malattia virale e sono stati confermati positivi per NEI. Nei due mesi successivi, a distanza di 15 gg., sono stati effettuati dei campionamenti di 10 carpioni per gabbia, dai quali è stato effettuato l'esame virologico per SEV e NEI in accordo alla Decisione 1554/2015: isolamento su colture cellulari e real time PCR da pool di organi (milza, rene anteriore, cuore e/o cervello). Per tutto il periodo della prova la temperatura dell'acqua è stata di 8-10°C, cioè compresa nel range ottimale per lo sviluppo della malattia. Tutti i campioni sono risultati negativi, pur persistendo a distanza di circa 2 mesi ancora alcune trote iridee infette e con sintomatologia clinica in atto. Avendo testato 120 animali per un periodo abbastanza lungo, utilizzando anche tecniche di biologia molecolare altamente sensibili e specifiche, in totale assenza di sintomatologia clinica degli animali si può affermare che il carpione (*Salmo carpio*) risulta essere una specie resistente alla malattia e molto probabilmente non funge neppure da vettore del virus. Sarebbe inoltre interessante poter confermare, con prove di campo analoghe, anche la sua resistenza nei confronti della SEV, al fine di poter ufficialmente considerare questa specie resistente alle malattie virali notificabili previste dal D. Lgs. 148/2008.

VALUTAZIONE DEI RISCHI SANITARI CHE SI POSSONO INCORRERE DURANTE OPERAZIONI DI IMMISSIONE DI FAUNA ITTICA IN ACQUE PUBBLICHE

Prearo M.^{1*}, Pastorino P.¹, Foglini C.¹, Maurella C.², Righetti M.¹, Burioli E.A.V.¹, Bona M.C.², Ru G.²

¹Laboratorio Specialistico di Ittiopatologia; ²BEAR BioStatistica, Epidemiologia e Analisi del Rischio – Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta – Torino

Lo spostamento di una specie da un luogo all'altro ad opera dell'uomo è una questione di enorme portata, che riguarda un numero elevato di entità faunistiche in tutti i continenti, con conseguenze spesso molto pesanti sull'equilibrio degli ecosistemi. Una specie ittica immessa può provocare danni considerevoli nel nuovo ambiente, poiché può essere causa della rottura dell'equilibrio in una comunità già stabilizzata. Quindi sono ben conosciuti i danni biologici ed ecologici che si possono avere con operazioni d'introduzione o traslocazione di fauna ittica. Molto meno indagati e presi in considerazione sono invece i rischi di tipo sanitario che si possono incorrere in questo tipo di operazioni. L'immissione di fauna ittica nei fiumi, è una pratica consolidata nei piani di immissione e di gestione delle acque pubbliche da parte delle amministrazioni locali e delle associazioni di settore. Attualmente la legislazione vigente impone severi controlli alle piscicoltura che allevano soggetti da semina solo per le malattie notificabili di origine virale (SEV, NEI, KHV), prescrivendo un iter certificativo chiaro. Purtroppo, non viene mai certificato e controllato il vero stato di salute delle partite introdotte: questo può provocare, più di quanto si possa pensare, un'introduzione nei bacini idrici di malattie di natura virale, batterica o parassitaria, non presenti in quel frangente e che possono essere trasmesse alla fauna ittica preesistente, aumentando il rischio anche per gli allevamenti ittici posti nelle vicinanze dell'immissione. Tra gli esempi che si possono ricordare, di immissione involontaria di patogeni in bacini idrici ed allevamenti in territori in cui le patologie non erano presenti, si annovera l'introduzione della NEI, della Bocca Rossa, della Lattococcosi, ecc. Riassumendo brevemente i possibili rischi che si possono incorrere nelle traslocazioni o immissioni controllate di fauna ittica in un determinato territorio, possiamo distinguere: 1) - rischi ambientali, dovuti a perdita della biodiversità; 2) - rischi sanitari per la fauna ittica con l'introduzione di nuovi patogeni o di patogeni con una diversa attività e un diverso tropismo sull'ospite; 3) - rischi sanitari per i fenomeni di antibioticoresistenza, con l'introduzione di nuovi germi o di germi con uno spettro di resistenza agli antibiotici molto marcato; 4) - rischi sanitari per l'uomo con la possibile trasmissione di potenziali patogeni zoonosici; 5) - rischi economico-sociali, i quali non appaiono di importanza primaria come i precedenti, ma rivestono un ruolo importante soprattutto in alcune categorie di stakeholder. Tutti questi rischi devono essere sempre tenuti in considerazione dagli amministratori del bene pubblico e dalle autorità sanitarie competenti, in quanto la perdita della biodiversità a causa di introduzioni poco oculate genera un malessere diffuso in alcuni ambiti della popolazione e l'introduzione di patogeni può causare gravi problematiche sanitarie, sia sull'ittiofauna selvatica che nelle realtà produttive legate al territorio; è di assoluta e imprescindibile priorità cercare di salvaguardare lo stato di salute, sia delle popolazioni ittiche nelle acque pubbliche, che degli stock presenti negli allevamenti, assicurando che le immissioni di materiale ittico vengano effettuate con pesci sani, controllati e certificati all'origine esenti da malattie infettive ed infestive. Pertanto, per una corretto approccio a queste problematiche sanitarie, la valutazione del rischio (*risk assessment*) e le pratiche di biosicurezza devono diventare i due pilastri fondamentali. Nelle misure di biosicurezza si dovrà comprendere anche un'adeguata regolamentazione da parte delle amministrazioni ed un severo autocontrollo da parte di chi fornirà il materiale ittico per le semine. Baluardi per una corretta gestione di questa problematica sono la reale conoscenza del problema a tutti i livelli, il continuo monitoraggio territoriale per conoscere e individuare possibili rischi e la creazione di una rete capillare su tutto il territorio nazionale per la gestione di tali problematiche. La politica nazionale e quella locale non possono esimersi dall'affrontare queste problematiche, che sempre di più assumeranno un'importanza nei costi di gestione e di mantenimento della salute pubblica nella società moderna.

SEMINE DI SPECIE ITTICHE IN ACQUE PUBBLICHE: ASPETTI SANITARI E PROBLEMATICHE APERTE

Salvador P.A.¹, Fabris A.^{1*}, Prearo M.², Maroni Ponti A.³, Dalla Pozza M.⁴, Manfrin A.⁴

¹Associazione Piscicoltori Italiani (API), Verona; ²Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino; ³Ministero della Salute, Roma; ⁴Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro (PD)

Le immissioni di fauna ittica in acque pubbliche comportano un insieme di azioni che devono essere coerenti con la tutela della fauna ittica, secondo quanto previsto dal quadro normativo di riferimento ai livelli nazionale ed europeo e nel rispetto della normativa sanitaria, in particolare di quanto disposto dal Decreto legislativo n. 148/08 (attuazione della Direttiva 2006/88/CE) e da tutti gli atti successivi ad esso collegati.

Le semine in acque pubbliche di pesci possono avere scopi diversi: immissioni per ripopolamento, per pesca sportiva con soggetti “pronta pesca” e immissioni a seguito d'asciutta sono le principali tipologie. Connessi a tali introduzioni si possono avere rischi sanitari di natura e con incidenza diversa che non sono solamente riconducibili alla possibilità di diffondere necrosi ematopoietica infettiva e setticemia emorragica ai salmonidi e a tutte le altre specie sensibili selvatiche e allevate come indicato dal sopracitato D.lgs. 148/08.

Ai fini della tutela dello status sanitario anche delle aziende di acquacoltura esistenti nei bacini idrici oggetto di immissioni, si ipotizzano e descrivono alcune scenari e si propongono alcune soluzioni e strategie che coinvolgono gli operatori del settore acquacoltura e della pesca sportiva e le Pubbliche Amministrazioni.

FINE FOOD FOR FISH (4F) – LA RICERCA AL FIANCO DELL’ACQUACOLTURA NAZIONALE

Saroglia M.¹, Gasco L.², Prearo M.^{3*}, Terova G.¹, Pulina P.⁴, Uzzau S.⁵, Labra M.⁶, Mariani P.⁷, Lorenzetti R.⁸, Anedda R.⁵, Hardy R.⁹, Zoccarato I.²

¹Dpt. Biotecnologie e Scienze della Vita, Università degli Studi dell’Insubria, Varese; ²Dpt. Scienze Agrarie, Forestali e Alimentari, Università degli Studi di Torino, Grugliasco (TO); ³Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d’Aosta, Torino; ⁴Dpt. Scienze della Natura e del Territorio, Università degli Studi di Sassari, Sassari; ⁵Porto Conte Ricerche, Alghero (SS); ⁶Dpt. Biotecnologie e Bioscienze, Università degli Studi di Milano-Bicocca, Milano; ⁷Parco Tecnologico Padano, Lodi; ⁸Consorzio Italbiotec, Milano; ⁹Aquaculture Research Institute, Idaho University, Hagerman, Idaho, USA.

Da uno studio del 2012, commissionato dall’UE, si evince come le stime di crescita dell’acquacoltura europea per il 2030 siano in netto aumento rispetto alle stesse del 2010, con valori del 41% per le produzioni dulciacquicole e del 112% per quelle marine. Questo comporta inevitabilmente di programmare la produzione di mangimi su basi di sostenibilità. Anche se i miglioramenti tecnologici ed il controllo delle patologie con accurati protocolli di biosicurezza dovrebbero consentire il miglioramento delle efficienze di conversione, la sostenibilità dell’acquacoltura rimane legata al rapporto tra la quantità di risorsa oceanica spesa per la produzione di una equivalente quantità di pesce allevato. La ricerca in tal senso è attiva con risultati che hanno permesso all’industria mangimistica di effettuare progressive sostituzioni di farine e oli di pesce, con sorgenti proteiche e lipidiche alternative. In Italia, la situazione relativamente ai finanziamenti pubblici per la ricerca scientifica di appoggio al settore acquacoltura, ha avuto il suo punto massimo negli anni ’80, con un’importante crescita del settore, ma è poi scemata nel decennio successivo, fino alla situazione attuale, impoverendo le strutture di ricerca nazionali che hanno perso di competitività per l’accesso a finanziamenti comunitari. Questo ha comportato una flessione nello sviluppo delle imprese di produzione e conseguentemente delle imprese di servizio, compresa l’industria mangimistica. Al fine di promuovere il ruolo dell’acquacoltura nazionale nella ripartizione di crescita prevista dall’Unione Europea, si rende necessario raccogliere la sfida da parte degli enti finanziatori istituzionali, al fine di consentire una ripresa delle strutture di ricerca operanti sul territorio italiano, finanziando studi in grado di fornire un valido supporto alle industrie mangimistiche, ma soprattutto a tutte le aziende di acquacoltura. Tale sfida è stata raccolta dal consorzio del Progetto AGER che, nel 2015 ha bandito un concorso per finanziare con 1,5 milioni di euro, progetti di ricerca sulla nutrizione in acquacoltura con diretta ricaduta sulle industrie di settore. Il Progetto AGER nasce dalla collaborazione e dall’unione di diverse fondazioni di origine bancaria (capofila Fondazione Cariplo) per promuovere e sostenere la ricerca scientifica nell’agroalimentare italiano, mettendo al centro del finanziamento le produzioni italiane d’eccellenza e puntando al miglioramento dei processi e allo sviluppo di tecnologie all’avanguardia. L’obiettivo delle Fondazioni è il rafforzamento della leadership dell’agroalimentare italiano, preservando il delicato equilibrio tra rese produttive e sostenibilità ambientale delle filiere agricole.

Il progetto “*Fine Food For Fish (4F)*”, del quale l’Università degli Studi dell’Insubria è il capofila, focalizza la ricerca su trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*) e spigola (*Dicentrarchus labrax*), ricercando nuove strategie alimentari attraverso la riduzione di farine ed oli di pesce, a favore di diete basate su fonti alternative di natura vegetale o animale. I pesci reagiscono alla sostituzione dei componenti della dieta, modificando la risposta produttiva, la qualità del filetto, la risposta alle malattie e causando spesso anche un impatto sull’ambiente. Si rendono perciò necessari degli adattamenti e delle integrazioni nutraceutiche che richiedono ancora delle verifiche e degli aggiustamenti. Le problematiche che il progetto intende affrontare sono: l’utilizzo efficiente di aminoacidi, della taurina e degli SCFAs usati come integratori; maggior efficienza delle diete a base di proteine vegetali e valutazione della sostituzione delle fonti proteiche ittiche con farina di insetto e/o di avicoli; ruolo del microbiota nella risposta di efficienza e benessere ai mangimi somministrati; valutazione dei meccanismi biologici alla base della selezione di ceppi di trota iridea maggiormente idonei all’alimentazione a base di proteine vegetali.

La ricaduta di questo progetto sarà un aiuto all’industria mangimistica e dell’allevamento, andando a valutare il benessere nutrizionale dei pesci, l’impatto sulla qualità del prodotto finale, l’impatto e la sostenibilità delle nuove diete a livello produttivo e ambientale, oltre che i costi di produzione.

NUOVI INGREDIENTI E SOTTOPRODOTTI PER MIGLIORARE SOSTENIBILITÀ, PRODUTTIVITÀ, BENESSERE, QUALITÀ E SICUREZZA ALIMENTARE DELLE SPECIE ITTICHE ALLEVATE

Tibaldi E.^{1*}, Aleandri R.², Lunelli F.³, Marino G.⁴, Olivotto I.⁵, Parisi G.⁶, Pomilio F.⁷, Volpatti D.¹

¹Università degli Studi di Udine, Dipartimento di Scienze Agroalimentari, Ambientali e Animali (DI4A); ²CREA-PCM-Centro di ricerca per la produzione delle carni e il miglioramento genetico; ³Fondazione Edmund Mach; ⁴Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale – Dipartimento Uso Sostenibile delle Risorse- Acquacoltura; ⁵Università Politecnica delle Marche - Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente; ⁶Università degli Studi di Firenze - Dipartimento di Scienze delle Produzioni Agro-Alimentari e dell'Ambiente; ⁷Istituto Zooprofilattico dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale"

SUSHIN è un progetto triennale recentemente finanziato da AGER (Fondazioni in rete per la Ricerca Agroalimentare), finalizzato allo studio ed alla ricerca di nuovi ingredienti da utilizzare nella formulazione di mangimi per le principali specie ittiche allevate in Italia. Esso intende rispondere alla necessità di ridurre l'utilizzo di farine e oli di pesce (FAO, 2014) nei mangimi per l'Acquacoltura ponendosi come obiettivi l'acquisizione, la diffusione ed il trasferimento di conoscenze scientifiche su ingredienti alternativi per la formulazione di diete innovative nella filiera produttiva dell'acquacoltura. E' proposto da 7 partners appartenenti ad università e centri di ricerca nazionali di alto profilo scientifico, con consolidata e multidisciplinare esperienza nel settore dell'acquacoltura. La responsabilità scientifica del progetto è in capo all'Università di Udine. Completano il partenariato l'Istituto Zooprofilattico dell'Abruzzo e del Molise, l'Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale (ISPRA), la Fondazione Edmund Mach di San Michele all'Adige (TN), l'Università degli Studi di Firenze, il Centro di Ricerca per la Produzione delle Carni e il Miglioramento Genetico del CREA e l'Università Politecnica delle Marche.

Con esperimenti di laboratorio e prove aziendali, utilizzando avanzati metodi di ricerca multidisciplinare, il progetto intende valutare il valore nutritivo di nuovi ingredienti o alimenti zootecnici sottoutilizzati quali le farine ottenute da insetti, dai residui di macello avicolo, da crostacei e da microalghe, e la performance di crescita, lo stato di salute e benessere, la qualità e la sicurezza alimentare di trota, branzino ed orata alimentati con una nuova generazione di diete dove quote rilevanti di mangimi semplici convenzionali, di origine marina e vegetale, sono sostituiti dai nuovi ingredienti. La valutazione delle diete innovative sarà completata dall'analisi di sostenibilità i) ambientale (LCA) ii) economica, intesa come produttività e redditività per le imprese iii) sociale, intesa come percezione e consenso da parte del consumatore e del mercato per prodotti ittici allevati con diete innovative.

Si tratta di un progetto coordinato, organizzato in pacchetti di lavoro che prevedono la restituzione di risultati parziali o aggregati con cadenze temporali definite. Include azioni principali di indagine scientifica, svolte presso laboratori, facilities dedicate, allevamenti ittici (SMEs) con la collaborazione di una azienda mangimistica nazionale. La partnership assicura la qualità scientifica indispensabile per questo tipo d'indagini e mette a disposizione facilities per la produzione di microalghe e per le prove biologiche su scala di laboratorio, oltre a laboratori di chimica degli alimenti, chimica clinica, microbiologia, biologia molecolare, istologia, immunologia. Assicura l'accesso a database e a tutti i servizi informatici indispensabili per un efficace piano di comunicazione e la disseminazione dei risultati lungo l'intera durata del progetto.

ABSTRACT

Poster

STUDIO DELLA FAUNA PARASSITARIA IN GATTUCCI (*SCYLIORHINUS CANICULA*) PROVENIENTI DA CAMPAGNE SPERIMENTALI DI PESCA A STRASCICO

Gangemi J.¹, Gaglio G.², Napoli E.², Rinelli P.³, Giorgianni P.², Marino F.¹

¹Università degli Studi di Messina, Dipartimento di Scienze Chimiche, Biologiche, Farmaceutiche ed Ambientali, Polo Universitario Papardo, Viale Stagno d'Alcontres, 31 98166, Messina; ²Università degli Studi di Messina, Dipartimento di Scienze Veterinarie, Polo Universitario dell'Annunziata 98168, Messina; ³Consiglio Nazionale delle Ricerche, Via S. Raineri 4 98122, Messina.

E' stato condotto uno studio sugli endoparassiti di *Scyliorhinus canicula*, pescati nel Mar Ionio, al fine di ampliare le conoscenze in ambito epidemiologico e strettamente parassitologico sulla parassitofauna di questi esemplari, solitamente studiati più dal punto di vista comportamentale e ambientale. Gli esemplari di *S. canicula* provenivano da campagne di pesca sperimentali, effettuate sulle coste della Sicilia Sud-Orientale ed in particolare nelle acque antistanti la città di Siracusa. I gattucci, una volta pervenuti in laboratorio, sono stati identificati con un codice alfanumerico e registrati i valori di peso e lunghezza. Per la ricerca dei parassiti gastrointestinali è stata utilizzata la tecnica del total worm count (TWC). Il materiale così ottenuto, veniva successivamente versato in capsule Petri ed osservato allo stereomicroscopio al fine di verificare la presenza o meno di parassiti. In seguito, i parassiti sono stati chiarificati in glicerolo e osservati al microscopio ottico e identificati con le classiche chiavi tassonomiche. Il peso dei gattucci era variabile da 96 g a 423 g con una media di 256 g. La lunghezza variava da 31,5 cm a 50 cm con una media di 41,7 cm. All'esame esterno erano evidenti emorragie, dovute probabilmente al trauma da trawling lesions ovvero lesioni da strascico. All'esame della cavità celomatica, non sono state evidenziate alterazioni macroscopicamente evidenti, gli organi infatti risultavano essere tutti intatti. Su 87 esemplari di *S. canicula*, sono risultati positivi alla presenza di parassiti 81, con una prevalenza del 94,2%. Su ogni esemplare è stato analizzato l'apparato digerente dal quale sono stati isolati ed identificati il nematode *Proleptus obtusus* appartenente alla famiglia Physalopteridae e il cestode *Eutetrarhynchus ruficollis* appartenente alla famiglia Eutetrarhynchidae. *P. obtusus*, era presente in 81 soggetti, sia nello stomaco che nella valvola a spirale e il cestode *E. ruficollis*, presente in due soggetti solo nella valvola spirale, con una prevalenza pari a 2,3%. Per quanto riguarda il parassita *P. obtusus* presenta come ospiti intermedi dei crostacei decapodi, come il paguro *Pagurus bernhardus* ed il granchio *Carcinus maenas*. Le larve, si annidano in uno di questi ospiti intermedi paratenici e lo *S. canicula* essendo bentonico se ne ciba, diventando così l'ospite definitivo. *P. obtusus* non risulta essere specie-specifico, poiché è presente in altri Selacei, come *Squalus acanthias*, *Mustelus mustelus* e *Aetobatus narinari*, però nel Mediterraneo lo *S. canicula* e lo *S. stellaris* risultano essere gli unici ospiti per questo parassita. Invece il cestode *E. ruficollis* è stato ritrovato nel *Mustelus mustelus* lungo le coste del Brasile e dell'Adriatico, e mai in esemplari di *S. canicula* nel Mediterraneo, per cui la nostra ci risulta essere la prima segnalazione di questo cestode nello *S. canicula*. Gli studi sulla composizione della parassitofauna di popolazioni ittiche selvatiche risultano importanti, in quanto gli elasmobranchi giocano un ruolo importante, in genere come ospiti definitivi, nel ciclo biologico di molti parassiti, essendo essi in cima alla catena trofica. Inoltre molte specie di elasmobranchi sono in via d'estinzione ed i campionamenti e gli studi sono sporadici e soprattutto limitati a progetti di ricerca riguardanti la biodiversità e monitoraggio ambientale. Con questa esperienza abbiamo voluto dare un contributo alla scarsa conoscenza dei patogeni che interessano questi particolari animali marini.

BATTERI DELLA FAMIGLIA *MIDICHLORIACEAE* (ORDINE *RICKETTSIALES*): POSSIBILI PATOGENI EMERGENTI PER I VERTEBRATI?

Cafiso A.¹, Serra V.¹, Petroni G.², Comandatore F.¹, Bazzocchi C.^{1,3}

¹Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Milano, Milano (MI); ²Dipartimento di Biologia, Università di Pisa, Pisa (PI); ³Centro di Ricerca Coordinato Epidemiologia e Sorveglianza Molecolare, Università degli Studi di Milano, Milano (MI)

La famiglia *Midichloriaceae* è una famiglia batterica il cui nome deriva da *Midichloria mitochondrii*, simbionte intramitocondriale presente nell'ovario della zecca *Ixodes ricinus* (Montagna et al., 2013). Le *Midichloriaceae* sono comparabili, per numero di specie e per complessità, alle altre due famiglie dell'ordine *Rickettsiales* (*Rickettsiaceae* ed *Anaplasmataceae*), di cui fanno parte diversi batteri intracellulari patogeni per l'uomo ed altri vertebrati. In seguito alla scoperta di *M. mitochondrii* in *I. ricinus* e di batteri a esso correlati in altre specie di zecca dura, altri batteri della famiglia *Midichloriaceae* sono stati osservati in organismi molto diversi tra loro, spaziando da artropodi parassiti (ad esempio, pulci e cimici dei letti) e organismi dei phyla Porifera e Cnidaria, fino ad arrivare a organismi acquatici quali protisti appartenenti a specie di ciliati e ad amebe patogene del genere *Acanthamoeba* (Montagna et al., 2013). L'associazione di alcune midichloriaceae con organismi parassiti fa supporre un loro possibile coinvolgimento nel ruolo patogeno svolto dall'ospite parassita. Questa ipotesi è in primo luogo supportata da dati molecolari e sierologici riguardanti *M. mitochondrii* in *I. ricinus*: è infatti noto che questo batterio, presente anche nelle ghiandole salivari e nel rostro della zecca, viene trasmesso all'ospite vertebrato durante il pasto di sangue (Mariconti et al., 2012; Bazzocchi et al., 2013), anche se il suo destino, una volta inoculato nell'ospite, è tutt'ora ignoto. Altre linee di evidenza riguardanti l'infettività di batteri ascritti alla famiglia *Midichloriaceae* sono riscontrabili nell'ipotesi di un loro coinvolgimento nello sviluppo di patologie quali la red mark syndrome/strawberry disease nella trota iridea (*Onchorhynchus mykiss*) (Cafiso et al., 2015) e di un possibile ruolo come coadiuvante nello sviluppo delle cheratiti oculari da *Ancanthamoeba* spp. Tuttavia al momento la potenziale patogenicità di alcuni membri della famiglia *Midichloriaceae* per l'uomo e altri vertebrati deve ancora essere dimostrata. Ad esempio, in soggetti parassitati da zecca che mostrano aspetti clinici attribuibili a rickettsiosi o ehrlichiosi, ma che mancano di titolo anticorpale contro microrganismi trasmessi tipicamente con il morso da zecca, le infezioni dovrebbero essere re-investigate sulla base di segni derivanti da infezioni correlate a *Midichloriaceae*. In conclusione, quindi, diversi aspetti suggeriscono il possibile ruolo di alcuni membri appartenenti alla famiglia *Midichloriaceae* come agenti infettivi/patogeni per i vertebrati.

Bazzocchi C., Mariconti M., Sasser D., Rinaldi L., Martin E., Cringoli G., Urbanelli S., Genchi C., Bandi C., Epis S. (2013). Molecular and serological evidence for the circulation of the tick symbiont *Midichloria* (Rickettsiales: *Midichloriaceae*) in different mammalian species. *Parasit Vectors* 6, 350–56.

Cafiso A., Sasser D., Serra V., Bandi C., McCarthy U., Bazzocchi C. (2016). Molecular evidence for a bacterium of the family *Midichloriaceae* (order *Rickettsiales*) in skin and organs of the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) affected by red mark syndrome. *J Fish Dis*, 39: 497–501.

Mariconti M., Epis S., Gaiban, P., dalla Valle C., Sasser D., Tomao P., Fabbi M., Castelli F., Marone P., Sambri V., Bazzocchi C., Bandi C. (2012). Humans parasitized by the hard tick *Ixodes ricinus* are seropositive to *Midichloria mitochondrii*: is *Midichloria* a novel pathogen, or just a marker of tick bite? *Pathog Glob Health*, 106: 391–396.

Montagna M., Sasser D., Epis S., Bazzocchi C., Vannini C., Lo N., Sacchi L., Fukatsu T., Petroni G., Bandi C. (2013). “*Candidatus* *Midichloriaceae*” fam. nov. (Rickettsiales), an ecologically widespread clade of intracellular alphaproteobacteria. *Appl Environ Microbiol*, 79: 3241–3248.

RISULTATI PRELIMINARI SULLA RISPOSTA ANTIOSSIDANTE IN ORGANI DI MUGGINI (*LIZA RAMADA*) PROVENIENTI DA DUE STAGNI DELLA SARDEGNA OCCIDENTALE

Antuofermo E.¹, Caldaroni B.², Magara G.², Scanzio T.³, Pais A.⁴, Ariu R.¹, Polinas M.¹, Scoparo M.², Righetti M.³, Dörr A.J.M.², Elia A.C.², Prearo M.³

¹Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università di Sassari, Via Vienna, 2 - 07100 Sassari; ²Dipartimento di Chimica, Biologia e Biotecnologie, Via Elce di Sotto, 8 - 06100 Perugia; ³Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Via Bologna, 148 - 10154 Torino; ⁴Dipartimento di Agraria, Università di Sassari, Viale Italia, 39 - 07100 Sassari.

La micobatteriosi è una malattia cronica o acuta, sistemica, di tipo granulomatoso che colpisce sia i pesci selvatici che quelli di allevamento causata da micobatteri atipici. La trasmissione di tali batteri avviene tramite il consumo di cibo infetto, o può entrare nell'ospite tramite lesioni o abrasioni della pelle o parassiti esterni. I micobatteri possono rimanere vitali nell'ambiente per due anni o più, o nelle carcasse e organi per più di un anno. I sintomi della micobatteriosi sono aspecifici e possono variare se associati ad altre patologie nei pesci; le manifestazioni della micobatteriosi possono presentarsi in forma acuta o cronica e più spesso in forma asintomatica. La forma cronica è la forma più comune, mentre quella acuta è rara ed è caratterizzata da alta morbilità e rapida mortalità con scarsi segni clinici. Anche le infestazioni da parassiti sono una componente importante nelle patologie dei pesci, sia allevati che selvatici, in quanto causando riduzione della produttività animale e quindi anche perdite economiche, rappresentano uno dei problemi più rilevanti nella fauna ittica. Tra i vari effetti che possono verificarsi nelle specie ittiche con infezioni da parassiti o da batteri vi è quello dell'aumento della concentrazione intracellulare di specie reattive dell'ossigeno (ROS) con conseguente sbilanciamento della difesa antiossidante.

Lo scopo del presente studio è quello di valutare lo stato delle difese antiossidanti di esemplari di muggini appartenenti alla specie *Liza ramada* con lesioni viscerali da micobatteri e da parassiti, mediante misurazioni delle attività enzimatiche dei principali markers antiossidanti quali superossido dismutasi (SOD), catalasi (CAT), glutatione perossidasi (GPx) e glutatione S-transferasi (GST).

Le analisi enzimatiche sono state condotte nella milza e nel fegato di esemplari di femmine di muggini pescati negli stagni di Cabras e del Calich (Sardegna Occidentale). Esemplari di sesso femminile non mostrandoti lesioni macro e microscopiche agli organi e provenienti dalle stesse località, sono state utilizzate quale campione di controllo.

Dai risultati preliminari si evidenzia un generale aumento dei livelli dei biomarcatori nelle milze dei muggini di Cabras, sebbene però la significatività statistica è raggiunta solo per GST e GPx. Nessuna importante variazione è stata registrata nei campioni provenienti dallo stagno del Calich. Le stesse analisi condotte sul fegato degli stessi campioni hanno indicato un generale aumento dei livelli di SOD e CAT negli esemplari del Calich e nessuna marcata variazione in quelli di Cabras. Queste prime analisi indicano una bassa pressione stressogena in esemplari affetti da micobatteriosi rispetto ad pesci sani.

Nel presente studio è stato anche analizzato un campione di esemplari femmine di *Liza ramada* prelevati dagli stessi siti per verificare gli effetti della carica parassitaria sugli stessi biomarcatori e tessuti. Contrariamente a quanto osservato per gli esemplari con micobatteriosi, si è potuto registrare una marcata diminuzione di GPx nel fegato e nella milza dei pesci prelevati al Calich. Ciò indicherebbe una maggiore pressione ossidativa negli esemplari affetti da parassitosi rispetto ai controlli sani.

Tuttavia nuove indagini sono necessarie per correlare i livelli degli indici biochimici con la carica batterica e parassitaria considerata. Tali valutazioni possono fornire precoci indicazioni sullo stato di salute di questa importante specie ittica per eventuali interventi risanatori tempestivi ancor prima che il danno diventi irreversibile. Si rendono pertanto necessari ulteriori sviluppi nella ricerca per validare la metodica e aumentare il numero degli esemplari e i siti di campionamento.

UTILIZZO DELLO SPETTROMETRO DI MASSA MALDI-TOF PER L'IDENTIFICAZIONE DI GERMI AMBIENTALI PROVENIENTI DA ACQUE DI TRASPORTO DI PESCI ORNAMENTALI D'IMPORTAZIONE

Adriano D.¹, Righetti M.², Lai J.¹, Previto G.¹, Dellerba D.², Foglini C.², Corvonato R.¹, Zanoni R.G.³, Decastelli L.¹, Prearo M.²

¹Laboratorio Controllo Alimenti; ²Laboratorio Specialistico di Ittiopatologia - Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino; ³Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Alma Mater Studiorum, Ozzano Emilia (BO).

Le patologie che colpiscono prevalentemente i pesci ornamentali sono malattie batteriche, la maggior parte delle quali sostenute da Gram negativi. Negli impianti di allevamento dei pesci ornamentali gli antibiotici, oltre ad essere utilizzati per la terapia, spesso sono impiegati nei trattamenti di profilassi, sia prima della commercializzazione, che aggiunti all'acqua di trasporto per impedire l'eventuale insorgenza di potenziali patogeni durante la spedizione. Pertanto, l'importazione commerciale internazionale può risultare un'importante fonte di batteri, sia patogeni che ambientali, i quali possono presentare fattori di resistenza agli antibiotici: entrambi questi aspetti vanno meglio studiati. La tecnologia MALDI-TOF (M-T) esamina gruppi di proteine rilevate direttamente in batteri intatti. Il campione da analizzare viene miscelato con un composto chiamato matrice e tale miscela viene applicata su una piastrina e ionizzata in seguito ad irradiazione con un laser. La matrice assorbe la luce laser e vaporizza insieme al campione acquisendo una carica elettrica. Uno o più campi elettrici proiettano gli ioni nel tubo di volo dello spettrometro di massa, che vengono separati in base al loro rapporto massa-carica: viene misurata la quantità di ogni ione ed il rilevamento viene effettuato alla fine del tubo di volo. Presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Torino è in uso la strumentazione Vitek[®] MS (bioMérieux): attualmente non è ancora attiva la banca dati accessoria da utilizzare per i patogeni di origine ittica, mentre viene comunemente utilizzato il database fornito dalla ditta produttrice, dove sono inseriti i profili di batteri patogeni per l'uomo, batteri presenti in microbiologia alimentare e germi ambientali. A tal proposito, si è voluto lavorare in questo contesto sul panel di batteri già presenti in banca dati; infatti scopo del presente lavoro è stato quello di valutare le performances di identificazione dello strumento su un panel di germi ambientali di origine ittica, prelevati da acque di trasporto di pesci ornamentali importati. Nel periodo primaverile del 2016, presso un centro di importazione di pesci ornamentali della provincia di Torino, sono stati prelevati 44 lotti di acqua di trasporto prelevati da altrettanti lotti di pesci provenienti da diversi paesi del sud-est asiatico. I campioni, dopo essere stati centrifugati a temperatura di 5°C a 2000 rpm per 15 minuti, sono stati seminati su MacConkey Agar antibiotato, prelevando 1 ml direttamente dal fondo provetta. Dai 44 lotti di acqua esaminati sono state isolate 144 colonie diverse per morfologia, le quali sono state clonate su Agar sangue e inviate all'identificazione al M-T. Delle 144 colonie isolate, ne sono state identificate 123 (85.42%), di cui 94 con una percentuale di identificazione superiore al 99%, mentre le restanti 29 con una percentuale di identificazione che variava tra il 33.3% ed il 95.9%. In questo studio, si è voluto considerare attendibile il valore di identificazione superiore al 99%; per i restanti campioni, 29 con una percentuale di identificazione inferiore al 99% e 21 in cui non si è giunti ad una identificazione, si sono allestite prove di identificazione biochimica mediante gallerie API (bioMérieux). Per una verifica analitica sono stati inoltre identificati biochimicamente anche 10 campioni presi casualmente tra quelli con identificazione certa. Delle 29 colonie identificate con le due differenti metodiche, 6 isolati batterici hanno presentato la medesima identificazione, 18 hanno presentato una corrispondenza solo di genere, mentre solo 5 colonie non vi è stata corrispondenza nemmeno di genere. I 10 campioni analizzati quali controlli, hanno dato la medesima risposta alla classificazione biochimica. Le specie batteriche maggiormente riscontrate sono state *Stenotrophomonas maltophilia*, *Ocrobactrum anthropi*, *Aeromonas hydrophila*, *A. sobria* e *Pseudomonas putida*. Dai risultati ottenuti, il 69,44% dei ceppi isolati (100/144) ha raggiunto un'identificazione attendibile al M-T: questa tecnica, se correttamente gestita, permette di ottenere un'identificazione più rapida, riducendo sia il tempo di esecuzione che il costo-analisi. Per migliorare l'attendibilità dei dati ottenuti è quindi necessario implementare il database con un numero maggiore di spettri provenienti da germi ambientali, oltre che iniziare a implementare le conoscenze anche sui germi patogeni di origine ittica.

PROVE DI TOSSICITA' IN VITRO SU MONOSTRATI CELLULARI DI PROVENIENZA ITTICA: L'ARSENICO INORGANICO

Arsieni P.¹, Prato R.¹, Brizio P.¹, Caruso C.¹, Righetti M.¹, Elia A.C.², Squadrone S.¹, Abete M.C.¹, Masoero L.¹, Prearo M.¹

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino; ²Dipartimento di Chimica, Biologia e Biotecnologie, Perugia.

Con l'introduzione della nuova normativa nazionale sulla sperimentazione animale (D. L.vo 4 marzo 2014, n. 26) è sempre più pressante ed imperativa la necessità di utilizzare sistemi alternativi all'impiego di animali, compresi i pesci, negli studi sperimentali; infatti, nella stesura dei protocolli per richiedere l'autorizzazione ministeriale alla sperimentazione, è indispensabile fornire specifiche motivazioni all'uso di modelli animali e dichiarare la mancanza di sistemi alternativi. All'uopo, la comunità scientifica sta valutando quindi di approntare dei modelli utili agli scopi di ricerca che tendano a sostituire il modello animale (Replacement). Nell'ottica di ottenere modelli alternativi nella valutazione della tossicità di alcuni metalli, nella ricerca corrente riguardante l'arsenico attivata presso l'IZS PLV di Torino, si è cercato di conseguire dei risultati attendibili, sostituendo il modello animale con colture cellulari di varia natura, sia di pesce che di mammifero, utilizzando nel nostro caso, monostrati di linee cellulari EPC e BF-2. Preliminarmente, per verificare la tossicità provocata sui monostrati cellulari, si è deciso di saggiare diverse concentrazioni di arsenico inorganico (As_2O_3) partendo da concentrazioni di 80 ppm e scendendo fino a concentrazioni di 0,05 ppm; più precisamente sono state allestite delle piastre a 24 pozzetti con monostrati cellulari di 24-36 ore, aventi una crescita a tappeto completa, esposte alle concentrazioni sperimentali di arsenico trivalente stabilite: 80, 60, 40, 20, 10, 5, 2,5, 1, 0,5, 0,1 e 0,05 ppm. In ogni piastra è stata allestita una serie di pozzetti in cui è stato inserito del terreno non addizionato, quale controllo negativo. Per ogni concentrazione, compreso il controllo negativo, sono stati allestiti 4 pozzetti in linea verticale; ogni concentrazione è stata saggiata su 4 serie diverse. La lettura delle piastre è stata condotta due volte al giorno per 5 giorni, onde valutare la presenza o meno di effetti tossici. A tutte le soluzioni saggiate è stato misurato il pH per verificare possibili effetti dannosi causati dallo stesso e non rapportabili direttamente al tossico. Il pH misurato variava da 9,53 nella soluzione con 80 ppm, per arrivare a valori di 7,7 nella soluzione a 1 ppm; alle concentrazioni tra 0,5 ppm e 0,05 ppm, il pH si è nuovamente attestato intorno alla neutralità (7,4÷7,01). La valutazione di possibili effetti tossici, mediante la visione al microscopio di cellule rifrangenti, in picnosi e veri e propri distacchi cellulari, ha portato all'identificazione delle diverse concentrazioni nelle differenti linee cellulari, in cui l'effetto tossico non compariva. La dose maggiore in cui non si è più osservato effetto tossico evidente è stata di 2,5 ppm per la linea EPC e 0,1 ppm per la linea BF-2. Una volta valutato il grado di sofferenza cellulare, si è deciso di saggiare le concentrazioni utili, andando a valutare, mediante il Comet test e la valutazione degli enzimi dello stress ossidativo, l'effetto diretto del composto inorganico dell'arsenico trivalente sui monostrati cellulari: si sono predisposte pertanto delle fiasche da colture cellulari da 25 cm², dove sono stati fatti crescere i monostrati cellulari (EPC e BF-2) che, una volta a confluenza (dopo circa 36-48 ore) sono stati inoculati con MEM-Earle addizionato con As_2O_3 alla concentrazione di 2,5 e 0,1 ppm rispettivamente, in modo da ottenere per le analisi successive, il quantitativo necessario di cellule trattate. Sono state inizialmente predisposte 9 fiasche per ciascuna linea cellulare, effettuando un prelievo di 3 fiasche a 24, 48 e 72 ore dopo l'inoculo dell'arsenico. Le cellule presenti nelle fiasche, al termine del periodo di intossicazione previsto, sono state risospese, immesse in provettoni da 50 ml e centrifugate a 2.000 rpm; il surnatante è stato eliminato ed il pellet ottenuto è stato congelato a -80°C con DMSO, secondo le procedure interne, in attesa delle indagini biomolecolari: tali attività sono ancora in corso di valutazione. Dai primi risultati ottenuti, l'utilizzo delle colture cellulari può essere facilmente impiegato in ecotossicologia per alcuni tipi di studio; in questo caso gli effetti che si possono valutare sono a breve termine (tossicità acuta), ma con concentrazioni basse, in quanto il pH presente nelle alte concentrazioni, influisce negativamente sulla crescita cellulare. I dati di sofferenza cellulare, associati a metodiche analitiche oggettive quali il Comet test e la determinazione dell'attività degli enzimi dello stress ossidativo potranno rappresentare un valido e complementare approccio agli studi tossicologici.

CASO DI MORTALITA' IN TROTE IRIDEE DA IDROCARBURI POLICICLICI AROMATICI (IPA) IN UN AMBIENTE DESTINATO AD USO ALIEUTICO

Foglini C.¹, Squadrone S.¹, Vivaldi B.², Pastorino P.¹, Ferrari A.², Abete M.C.¹, Prearo M.¹

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino; ²Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Genova.

Gli idrocarburi policiclici aromatici (IPA) sono idrocarburi solidi costituiti da due o più anelli aromatici. Hanno solubilità molto scarsa in acqua, sono solubili in molti solventi organici e sono lipofili. Derivano principalmente dal carbon fossile, dal petrolio, dalla combustione incompleta di materiale organico e da alcuni processi metallurgici. Hanno usi applicativi in coloranti, pesticidi, medicinali, componenti plastici. In natura gli IPA a basso peso molecolare sono degradati rapidamente ad opera di batteri e funghi, mentre i composti più pesanti sono scarsamente reattivi e quindi estremamente persistenti. In ambiente acquatico gli IPA possono evaporare o disperdersi nella colonna d'acqua per poi essere degradati attraverso processi biochimici. La quota che si disperde invece nei sedimenti, è soggetta a degradazione più lenta ed è assimilata negli organismi acquatici. Tra questi, i crostacei e altri invertebrati hanno la tendenza a bioaccumulare questi composti, mentre nei pesci alcuni IPA vengono rapidamente metabolizzati ed escreti. Per quanto riguarda i rischi per l'uomo, gli IPA sono classificati come cancerogeni e genotossici a vari livelli, sebbene la loro presenza in ambiente come miscela non permetta una facile valutazione del pericolo rappresentato dai singoli composti. Gli IPA non sostituiti inoltre non tendono ad accumularsi nei tessuti adiposi dei mammiferi, probabilmente a causa della loro rapida metabolizzazione.

Il caso in esame ha avuto luogo nel tardo inverno (inizi di febbraio 2016), dove si è verificata una copiosa moria di trote iridea (*Oncorhynchus mykiss*) avvenuta presso un bacino artificiale di pesca sportiva nel comune di Bormida (SV). Tale bacino, posto parallelamente al corso fluviale, attinge acqua direttamente dall'asta del fiume, riversandola nuovamente qualche centinaio di metri più a valle. L'acqua, durante l'episodio, si mostrava oleosa e lattiginosa, si poteva percepire un forte odore di idrocarburi e nel giro di poche ore dall'insorgenza del fenomeno, si è verificato il picco di mortalità, con alcuni soggetti morti aventi opercoli branchiali dilatati ed altri che avevano presentato nelle ore precedenti una sintomatologia nervosa o una letargia evidente. Sedici soggetti sono stati inviati refrigerati direttamente al Laboratorio Specialistico di Ittiopatologia dell'IZS di Torino per le analisi; tutti i soggetti mostravano unicamente una spiccata ipermucosità branchiale, accompagnata comunque da un forte odore di gasolio. In base all'anamnesi e alle valutazioni di laboratorio, la diagnosi è stata immediata e la causa morte è stata stabilita (anossia dovuta a ipermucosità branchiale e intossicazione acuta da idrocarburi). Si è provveduto quindi a inviare le branchie e il muscolo delle trote campionate al laboratorio chimico dell'IZS PLV di Genova, per la valutazione analitica degli IPA, anche per stimare il tipo di inquinamento avuto ed eventualmente procedere con misure di sicurezza. Le branchie e i muscoli dei soggetti campionati sono stati analizzati mediante HPLC/FLD (High Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection), andando a valutare i livelli di benzo(a)antracene (BaA), benzo(a)pirene (BaP), benzo(b)fluorantene (BbF), benzo(k)fluorantene (BkF), crisene (CRI) e dibenzo(a-h)antracene (DBahA). Analiticamente si è potuto rilevare un livello medio di 0,5 ppb di BaA e 1,9 ppb di BkF; gli altri composti non superavano il limite di quantificazione del metodo (0,2 ppb).

Con la certezza della causa dell'evento di mortalità occorso, le autorità locali, in accordo con i proprietari e gestori del lago, hanno ritenuto opportuno fermare l'attività di pesca ed eliminare i pesci sintomatici ancora presenti, visto anche i valori riscontrati a livello della parte edibile dei pesci, in modo da minimizzare il rischio per gli eventuali consumatori ed effettuare successivi controlli per determinare il grado di inquinamento residuo. Nonostante sia stata chiara la causa dell'evento di mortalità anomala, non si è riusciti ad individuare un colpevole dell'atto di sversamento, che ha portato ad un interessamento anche del tratto di fiume a monte e a valle del lago.

IL CASO POLCEVERA: GESTIONE DEL RISCHIO DOPO UN EVENTO STRAORDINARIO PER SALVAGUARDARE L'AMBIENTE E L'ITTIOFAUNA

Maurella C.¹, Pastorino P.², Bona M.C.¹, Ferrari A.³, Foglini C.², Desiato R.¹, Ru G.¹, Prearo M.², Bozzetta E.³

¹BEAR BioStatistica, Epidemiologia e Analisi del Rischio; ²Laboratorio Specialistico di Ittiopatologia – Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta – Torino; ³S.C. Liguria, Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Genova

Domenica 17 aprile 2016 ha ceduto un tubo dell'oleodotto della raffineria Iplom che si trova nella zona industriale di Genova, a poca distanza dal Fegino, piccolo rio che di lì a poco confluisce nel fiume Polcevera. Il fiume è risultato inquinato dal greggio già a partire dal giorno successivo a quello in cui è avvenuto lo sversamento. L'ittiofauna del fiume ne ha subito risentito e vi è stato un picco di mortalità della fauna ittica. Allo scopo di valutare l'eventuale persistenza di Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA) e in accordo alla Direttiva Quadro sulle Acque 2000/60/CE, l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Torino, nei giorni successivi l'evento ha proposto un piano di campionamento dell'ittiofauna e del macrobenthos nel fiume Polcevera, al fine di gestire il rischio dopo questo evento straordinario di inquinamento, onde valutare gli effetti a medio e lungo termine che lo sversamento può aver causato. Le attività di campionamento proposte hanno riguardato sia i siti e la periodicità di prelievo, sia le modalità, come di seguito riportato:

Siti e periodicità di prelievo - si è consigliato anzitutto di eseguire un primo prelievo in una zona a monte dell'Iplom che funga da controllo. Poiché lungo le sponde del Polcevera verso Nord vi sono diversi insediamenti industriali (tra i quali una cartiera), si è proposto di retrocedere, partendo dal Ponte al Polcevera, di circa 7 Km e andare oltre la confluenza del fiume Secca nel Polcevera e fino al campo di tiro. Si è suggerito di eseguire un paio di campionamenti su un asse che abbia come fulcro centrale il campo di tiro, allungando verso sud di un paio di Km; a valle dell'Iplom sono stati previsti due siti di campionamenti, uno nelle immediate vicinanze dell'impianto ed un secondo a livello della foce del Polcevera, che dista circa 3,5 Km dall'impianto. Nei due punti si è previsto vengano condotti campionamenti ogni 3 settimane per un periodo di 3 mesi (4 turni di campionamento, in due punti distinti per ogni turno);

Modalità di prelievo - i prelievi della fauna ittica dovranno essere eseguiti con "pesca elettrica"; la strategia dovrebbe prevedere il campionamento di una area definita, utilizzando un appropriato equipaggiamento da pesca, applicando le dovute precauzioni e misure di sicurezza, utilizzando personale qualificato; inoltre dovranno essere prelevati campioni di macrobenthos mediante retino immanicato; l'ubicazione del sito di campionamento dovrà essere registrata con un GPS o utilizzando punti di riferimento assoluti.

Nello stilare la proposta da sottoporre alle autorità locali, si è invitato a programmare i prelievi nelle giornate di martedì e/o mercoledì verso le 10,30 per consentire al personale competente dell'Istituto di raggiungere il luogo per coadiuvare i campionamenti. Su tutti i campioni prelevati nelle diverse sessioni di prelievo dovranno essere eseguiti dapprima gli esami anatomo-istopatologici dalle S.S. Ittiopatologia e S.S. Istopatologia e successivamente, con il prelievo di porzioni muscolari, gli esami chimici per la ricerca di IPA e di NDL-PCB effettuati dal laboratorio chimico della Sezione di Genova dell'IZS PLVA. Le forze messe in campo dalle varie strutture dell'IZS PLVA sono state puntuali ed hanno prodotto in modo efficace e preciso un piano di intervento per la valutazione a medio e lungo termine degli effetti inquinanti nell'ambiente idrico cittadino, il quale però non è stato accolto con favore dalle autorità locali che hanno preferito valutare il rischio solamente a breve termine e conducendo una azione in loco diretta a stimare il danno diretto. Resta comunque di importanza fondamentale la valutazione di tutti i possibili rischi in eventi straordinari del genere, in quanto la portata degli effetti negativi possono ripercuotersi anche dopo molto tempo sull'ambiente, sull'ittiofauna e sulla comunità bentonica fluviale. Questa operazione ha rappresentato comunque un servizio che l'Istituto ha fornito alla comunità in modo tempestivo, garantendo un valido supporto nella gestione di tali fenomeni.

STUDIO DELLE CORRELAZIONI TRA METALLI PESANTI E DEFORMITÀ SCHELETRICHE IN TROTE ASPROMONTANE

Pizzata A.^{1*}, De Benedetto G.¹, Giorgianni P.¹, Di Caro G.¹, Trombetta D.², Macheda S.⁵, Smeriglio A.², Salvo A.³, Siclari A.⁴, Macrì F.¹, Marino F.²

¹Dip. di Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Messina; ²Dip. di Scienze Chimiche, Biologiche, Farmaceutiche ed Ambientali, Università degli Studi di Messina; ³Dip. di Scienze biomediche, odontoiatriche e delle immagini morfologiche e funzionali, Sez. SASTAS; ⁴Ente Parco Nazionale dell'Aspromonte; ⁵Azienda Ospedaliera Bianchi-Melacrino Morelli, Reggio Calabria.

21 esemplari di trota fario (*Salmo trutta fario*) con evidenti deformità scheletriche coinvolgenti tutti i tratti del rachide, sono stati campionati all'interno del Massiccio Aspromonte- Calabria-Provincia di Reggio Calabria, inviati ai laboratori specifici per indagare l'eziologia di tali deformità. L'esame radiografico ha permesso di documentare gravi alterazioni a carico della colonna vertebrale, variamente rappresentate da lordosi, cifosi e scoliosi, unitamente a forme miste. Gli esemplari, all'esame necroscopico, non presentavano lesioni macroscopicamente evidenziabili e si escludevano odori riconducibili a processi alterativi. Inoltre, per tutta la lunghezza, si evidenziava un susseguirsi di irregolarità della silhouette, riconducibili alle alterazioni assiali del rachide. All'apertura della cavità celomatica, la topografia viscerale risultava rispettata e si escludeva la presenza di gas e liquidi attribuibili a processi patologici in atto. Non si evidenziavano alterazioni a carico di cuore, rene craniale e caudale, vescica natatoria, fegato, pancreas e milza. La muscolatura risultava esente da lesioni e perfettamente adesa alla colonna vertebrale che, invece, confermava quanto apprezzato esternamente riportando numerose deviazioni. A livello gastroenterico si è potuta documentare, in 14 soggetti su 18, un'infestazione massiva di nematodi appartenenti alla specie *Cysticoloides ephemeridarum*. All'esame anatomo-istopatologico non si documentavano lesioni degne di nota a carico degli organi celomatici. La colonna vertebrale mostrava alterazioni di forma lungo l'asse mediano e si escludeva la presenza di flavobatteri e protozoi. Inoltre, su un omogenato di tutti i visceri e tessuti sono state condotte indagini di spettrometria gamma, mirata all'eventuale misura di radioattività. I risultati ottenuti hanno però permesso di escludere tale ipotesi, in quanto i valori riscontrati rientrano nei livelli massimi stabiliti dal REG.: COM (2010)184 definitivo 2010/0098 (CNS). Gli esiti dell'esame tossicologico hanno fornito, nello specifico, notizie in merito al grado di contaminazione da metalli pesanti, con particolare riferimento a Cd e Zn i cui valori, ottenuti da campioni provenienti dalla colonna vertebrale, muscolo e fegato, hanno mostrato livelli uguali o superiori ai range previsti dal regolamento n.1881/2006 e successive modifiche, in particolar modo per i valori di Cd. Per quanto riguarda lo Zn, gli elevati valori rinvenuti nei tessuti delle trote analizzate rappresentano sicuramente un dato da non trascurare. Nelle specie ittiche, diversi studi hanno dimostrato che un eccesso di Zn induce deformità scheletriche, portando a torsione e scoliosi della colonna vertebrale ed alterazione del meccanismo di calcificazione in alcune aree vertebrali. Le norme vigenti non stabiliscono tenori massimi di Zn, né con riferimento agli alimenti destinati al consumo umano né per quelli destinati al consumo animale. Tuttavia è stato stabilito l'apporto settimanale tollerabile (TWI), utile per valutare il rischio per la salute umana. Nessuno degli altri metalli pesanti presi in esame è risultato superiore ai limiti di legge e, in qualche caso, si sono registrati livelli inferiori al minimo rilevabile. Dai risultati ottenuti si può ipotizzare che le deformità riscontrate potrebbero essere causate sia dall'elevato contenuto nel muscolo e nella colonna vertebrale dei metalli pesanti ricercati (in particolare Zn e Cd) sia dall'elevata carica parassitaria dei pesci e, quindi, dalla possibile conseguente deplezione di vitamina D, con le prevedibili alterazioni del metabolismo del Ca.

STUDIO ISTOLOGICO ED IMMUNOISTOCHEMICO DEL SISTEMA VASCOLARE SECONDARIO IN *CONGER CONGER*.

Musmanno A.I.J.^{1*}, Macrì D.², Ieni A.³, Corti I.⁴, Marino P.⁴, Marino F.¹

¹Dipartimento di Scienze Chimiche, Biologiche, Farmaceutiche ed Ambientali, ²3IZS Sicilia, Via G. Marinuzzi, 1, Palermo (PA); ³Dipartimento di Patologia Umana "G. Barresi", Università degli studi di Messina (ME); ⁴Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università degli studi di Messina (ME).

Il sistema vascolare secondario (SVS) è un sistema arterio-capillare-venoso presente nel derma di tutti gli *Actinopterygii*, derivante e parallelo al sistema vascolare primario, composto da anastomosi arterio-arteriose, capillari secondari e vene secondarie collettrici. La funzione del SVS resta ancor oggi poco chiarita ed oggetto di dibattito, con prove a favore di un importante coinvolgimento nella difesa immunitaria, trasporto dell'ossigeno, respirazione cutanea, scambio di sostanze nutritizie, rimozione di rifiuti, drenaggio tissutale regolazione ionica e controllo del pH sanguigno.

Nonostante le numerose analogie anatomiche con il sistema linfatico presente in mammiferi ed anfibi, nonché diversi autori antecedenti a favore del considerare il SVS come un effettivo precursore del linfatico propriamente detto, Rummer (2014) ne definisce il modello come non concorde dai punti di vista anatomico e funzionale. Lo scopo del lavoro è quindi identificare l'esistenza di un SVS in *Conger conger* e fornire dati in grado di supportare o smentire le conclusioni di Rummer dall'inedito punto di vista dei markers immunoistochimici, nonché approfondirne il ruolo filogenetico.

A tale fine, campioni di tessuto cutaneo e muscolare comprendenti le porzioni dorsale e ventrale della pinna protocerca sono stati prelevati dalle regioni caudale e post-ale di grongo europeo e sottoposti all'esame istologico ed immunoistochimico per gli anticorpi anti-CD34, CD31 e D2-40. Sia la colorazione Ematossilina-Eosina che la Tricromica di Masson hanno permesso di evidenziare la presenza di piccoli vasi nella gran parte dei casi privi di eritrociti, sempre limitrofi od addossati ai vasi principali, dal diametro notevolmente maggiore e sempre contenenti eritrociti, sia a livello del derma che della pinna. L'esame immunoistochimico ha dimostrato immunoreattività negativa per tutti gli anticorpi utilizzati, evidenziando l'assenza di espressione dei marcatori linfatici M2A, PECAM-1 e CD34 in tutti gli endoteli vascolari dei campioni analizzati. I dati in nostro possesso dimostrano per la prima volta, sulla base delle nostre conoscenze, l'esistenza di un SVS nel grongo europeo, rappresentando così la seconda segnalazione di SVS all'interno della famiglia dei *Congridae* (*Conger cinereus* – Toews et al 1983), ed avvalorano le conclusioni di Rummer: il SVS dovrebbe quindi essere considerato come un sistema ematico a tutti gli effetti e non correlato al sistema linfatico dei mammiferi. Quest'ultimo, quindi, dev'essersi probabilmente evoluto negli anfibi col ruolo di trasportatore lipidico; a favore di tale ipotesi, il SVS non è ancora stato riscontrato nei *Sarcopterygii*, antenati dei tetrapodi, ed il suo volume appare maggiormente correlato alle capacità natatorie piuttosto che la posizione filogenetica della specie.

Rummer J.L., Wang S., Steffensen J.F., Randall D.J. (2014). Function and control of the fish secondary vascular system, a contrast to mammalian lymphatic systems. *J. Exp. Biol.* 217:751-757.
Toews D.P., Holeton G.F., Heisler N. (1983). Regulation of the acid-base status during environmental hypercapnia in the marine teleost fish *Conger conger*. *J. Exp. Biol.* 107:9-20.

CISTI CARTILAGINEE DI ORIGINE PARASSITARIA IN ZEBRAFISH (*DANIO RERIO*)

Iaria C.^{1*}, Cantarella S.², Capparucci F.¹, Briguglio G.², Abbate J.², Comisi D.², Marino F.¹

¹ Dipartimento di Scienze Chimiche, Biologiche, Farmaceutiche ed Ambientali, Università degli Studi di Messina; Polo Universitario Papardo, 98158 Messina. ² Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Messina. Centro di Ittiopatologia Sperimentale della Sicilia (CISS); Polo Universitario dell'Annunziata, 98168 Messina.

La diffusione dell'uso di teleostei, in particolare dello zebrafish, nella sperimentazione animale sta comportando una maggiore attenzione alle patologie che possono inficiare lo stato di salute e l'esito degli studi sperimentali. Scopo del presente lavoro è stato descrivere delle inusuali cisti cartilaginee, in branchie di esemplari di zebrafish (*Danio rerio*), provenienti dal Centro di Ittiopatologia Sperimentale della Sicilia (CISS). Su un totale di 500 esemplari prelevati ed analizzati, 3 sono hanno riportato le suddette cisti di origine parassitaria. Essendo gli esemplari stabulati per fini sperimentali, risultava importante discriminare le patologie insistenti nell'impianto, in modo da evitare risultati sperimentali falsati dagli eventuali sintomi correlati. Le necroscopie e i campionamenti sono stati effettuati presso i laboratori del CISS. Nessuna lesione macroscopica veniva documentata. L'istopatologia permetteva di documentare a carico delle branchie diverse lesioni nodulari che alteravano l'architettura dei filamenti branchiali, incorporando nella neoformazione anche diverse lamelle secondarie e caratterizzate da un'iperplasia fibroblastica circondante una cavità centrale contenente residui di corpi parassitari. In periferia, comparivano isole di metaplasia condroide non in asse rispetto alle cartilagini proprie del filamento branchiale coinvolto. Il tipico aspetto definito "eye spot", caratterizzato da corpiccioli basofili tondeggianti, riferibili a metacercarie incistate, è stato repertato. Sebbene non sia ancora stata eseguita l'identificazione a livello molecolare del parassita che ha provocato tali lesioni, le abnormi trasformazioni tissutali reattive e la metaplasia cartilaginea provocate dall'insulto parassitario prolungato nel tempo, trovano analoghi corrispettivi in casi spontanei e sperimentalmente indotti descritti in letteratura e riferibili a metacercarie di trematodi digenei, in particolare riferibili al trematode *Centrocestus formosanus* (César Ortega et al., 2009). Simili lesioni branchiali sono state documentate dal nostro gruppo di lavoro anche in esemplari adulti di *Trachurus trachurus* pescati nel Tirreno meridionale (Briguglio et al., 2014). Resta da chiarire l'intimo meccanismo patogenetico della lesione, dall'induzione da parte delle metacercarie, fino all'evoluzione in nodulo fibro-cartilagineo, che può comportare dubbi nell'identificazione istopatologica della lesione. Il parassita, potenziale agente di zoonosi, è stato ripetutamente descritto in diverse specie ittiche dulciacquicole asiatiche ed americane, ma risulta un solo report ad oggi in Italia risalente al 1999 (Tampieri et al., 1999). Sulla base della conoscenza del ciclo biologico, si può individuare la provenienza dall'estero, verosimilmente in sistemi aperti, con possibilità di contatto con molluschi ed uccelli ittiofagi. Si evince pertanto l'importanza della provenienza dei pesci destinati alla sperimentazione solo da Stabilimenti Fornitori autorizzati, che forniscano idonee garanzie sullo stato di salute degli stessi.

Tampieri, M.P.; Caffara, M.; Diegoli, G.; Galuppi, R.; Marcer, F.; Mattioli, R.; Minelli, C.; Restan, R. 1999 Prima segnalazione in Italia di *Centrocestus armatus* e *C. formosanus* (Digenea, Heterophyidae) in pesci d'acqua dolce di importazione. Boll. Soc. It. Patol. Ittica, Italy, 27: 27-33.

Briguglio G.; Reina V.; Marino F.; Lanteri G.; Bottari T.; Gaglio G. Cisti cartilaginee di origine parassitaria in branchie di suro (*Trachurus trachurus*): istopatologia e considerazioni eziopatogenetiche. Boll. Soc. It. Patol. Ittica, Italy, 2014.

Ortega C.; Fajardo R.; Enríquez R. Trematode *Centrocestus formosanus* Infection and Distribution in Ornamental Fishes in Mexico. Journal of Aquatic Animal Health. 2014

APPLICAZIONE DI COLORAZIONI ISTOCHIMICHE ED IMMUNOISTOCHIMICHE PER L'IDENTIFICAZIONE DI PROTOZOI E MICROSPORIDI IN SPECIE ITTICHE MARINE

Varello K.¹, Gustinelli A.², Quaglio F.³, Abbamonte G.¹, Audino V.¹, Prearo M.¹, Caffara M.², Bozzetta E.¹, Fioravanti M.L.²

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino; ²Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Alma Mater Studiorum Università di Bologna, Ozzano Emilia (BO); ³Dipartimento di Biomedicina Comparata ed Alimentazione, Università di Padova, Legnaro (PD).

Tra le malattie che possono avere un notevole impatto sulla produttività delle specie ittiche d'allevamento vanno annoverate senz'altro quelle parassitarie. In particolare le parassitosi del tratto gastroenterico sostenute da protozoi del genere *Eimeria* e *Cryptosporidium* e da microsporidi possono interferire in modo rilevante con la funzionalità dell'apparato digerente e causare perdite economiche in acquacoltura. Negli ultimi anni le segnalazioni di infezioni enteriche da protozoi Apicomplexa e microsporidi in pesci marini allevati si stanno susseguendo, anche grazie all'affinamento delle metodiche d'indagine, soprattutto molecolari, che permettono una approfondita caratterizzazione eziologica dei parassiti stessi. Allo stesso tempo però le tecniche tradizionali, come l'istologia, continuano a rivestire un ruolo importante per lo studio eziopatogenetico e la diagnosi della patologia in atto, in quanto la associazione delle lesioni ad uno specifico agente eziologico rappresenta l'optimum per la gestione della patologia in allevamento. Scopo del presente lavoro è stato quello di valutare l'apporto diagnostico di metodiche istologiche, istochimiche ed immunoistochimiche nell'identificazione di coccidi e microsporidi in specie ittiche marine d'allevamento.

Sono stati inclusi nello studio campioni di stomaco e intestino prelevati da 40 rombi (*Psetta maxima*) e 53 orate (*Sparus aurata*) confermati positivi rispettivamente per *Cryptosporidium scophthalmi* ed *Enterospora nucleophila* e 43 campioni di archivio di 15 spigole (*Dicentrarchus labrax*) e 28 orate inclusi in paraffina con pregressa diagnosi di coccidiosi e microsporidiosi enterica da *Loma* sp. I campioni sono stati colorati con Ematossilina-eosina (EE) e con le colorazioni istochimiche PAS, Ziehl-Neelsen (ZN) Giemsa, Brown and Brenn (BB), Blu di toluidina (BT) e colorazione di Luna. Inoltre sui campioni con microsporidiosi è stata testata la colorazione immunoistochimica (IIC) con l'anticorpo policlonale anti-*Encephalitozoon cuniculi*.

Le colorazioni ZN e Giemsa si sono dimostrate efficaci nell'individuazione sia dei coccidi che dei microsporidi. In particolare la ZN è risultata utile per il rilevamento di *Cryptosporidium* sp., così come la BT, che ha permesso di individuarne con maggior efficacia gli stadi extracitoplasmatici. La PAS è stata di ausilio nell'evidenziare *Eimeria* sp. e *Cryptosporidium* sp. con ottimi risultati in particolare per rilevare gli stadi intraepiteliali, mentre per quanto riguarda i microsporidi ha dato scarsi risultati nell'evidenziazione delle spore all'interno degli xenomi. Queste ultime sono state invece ben messe in evidenza con BB che si è dimostrata utile anche per l'individuazione dei coccidi. La colorazione di Luna si è dimostrata molto efficace nell'evidenziazione dei microsporidi, sia per le spore all'interno degli xenomi nel caso della microsporidiosi enterica da *Loma* sp. nella spigola, che per *Enterospora nucleophila* nell'orate. Infine la IIC ha permesso di individuare sia le spore all'interno degli xenomi di *Loma* sp., che *Enterospora nucleophila*.

L'utilizzo delle colorazioni istochimiche per il rilievo di protozoi e microsporidi applicate si è rivelato di notevole ausilio per la diagnosi e la caratterizzazione degli aspetti istopatologici correlati alle infezioni da questi agenti nelle specie ittiche prese in considerazione, permettendo di associare la colorazione più indicata per i diversi agenti. Inoltre l'applicazione dell'IIC per l'individuazione di microsporidi con l'anticorpo anti-*Encephalitozoon cuniculi* ha dimostrato di poter essere un valido ausilio diagnostico, pur con i limiti dati dalla non specificità del siero per l'agente indagato, ed eventualmente fungere come punto di partenza per la messa a punto di metodiche IIC specifiche per i microsporidi ittici.

CASO DI NEOPLASIA EMOCITARIA IN UN MITILO (*MYTILUS GALLOPROVINCIALIS*)

Varello K., Francese D.R., Burioli E.A.V., Abbamonte G.¹, Serracca L., Meistro S., Ercolini C., Prearo M., Bozzetta E.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta.

La neoplasia emocitaria, anche conosciuta come leucemia o sarcoma, è ampiamente diffusa fra i bivalvi marini e di estuario. Essa risulta infatti segnalata in almeno 20 specie, spesso importanti dal punto di vista commerciale, tra cui ostriche (*Crassostrea* e *Ostrea* spp.), limecole (*Macoma* spp.), mussoli (*Mya* spp.), cuore (*Cerastoderma edule*) ed anche mitili (*Mytilus* spp.) (Barber, 2004; Ciocan & Sunila, 2005). Questa forma neoplastica è caratterizzata dalla proliferazione di cellule emocitarie atipiche aumentate di volume (2-4 volte rispetto alle cellule normali), anaplastiche, con nuclei ipercromatici, pleomorfi, nucleoli prominenti (Peters, 1988; Elston *et al.*, 1992) ed elevata attività mitotica (Mix, 1975). L'eziologia è ancora poca chiara e sicuramente multifattoriale. Sono state ipotizzate 5 categorie di possibili cause: virus, contaminanti ambientali, predisposizione genetica, biotossine e altri fattori stressanti (Barber, 2004).

La patologia conduce ad una progressiva perdita della normale architettura tissutale, attraverso la sostituzione delle cellule sane con cellule neoplastiche, portando a morte i soggetti colpiti. Talvolta essa presenta carattere epizootico, causando perdite economiche e comportando potenziali conseguenze ecologiche. L'esame istopatologico permette di acquisire informazioni in merito all'evoluzione della patologia, alla sua gravità e ai danni tissutali provocati.

Scopo del presente lavoro è quello di segnalare un caso di neoplasia emocitaria in un mitilo prelevato durante i campionamenti routinari in provincia di La Spezia.

Durante l'attività di monitoraggio per la ricerca di *Marteilia* spp. nei mitili (*Mytilus galloprovincialis*), sono stati prelevati 68 esemplari da 4 siti della provincia di La Spezia.

I soggetti sono stati sgucciati, fissati in Carson per 48 ore, sottoposti alle procedure standard di inclusione in paraffina ed al taglio al microtomo. Le sezioni dello spessore di $4 \pm 2 \mu$ sono state destinate alla colorazione con Ematossilina-Eosina (EE) ed osservate al microscopio ottico ad ingrandimenti crescenti (10, 20, 40x).

In uno dei soggetti analizzati, è stata osservata la presenza di un diffuso infiltrato, costituito da cellule neoplastiche, esteso ai tessuti connettivali e muscolari, alle branchie, al tessuto interstiziale peri-ghiandolare ed ai vasi. Le cellule si presentavano rotonde, di dimensioni notevolmente aumentate, con rapporto nucleo/citoplasma a favore del nucleo, in cui si potevano inoltre osservare cromatina dispersa e la presenza di uno o più nucleoli. L'indice mitotico appariva moderato. Il quadro istopatologico è risultato compatibile con neoplasia emocitaria.

Il caso presentato, pur se limitato ad un solo soggetto, risulta essere di interesse, in quanto la neoplasia emocitaria in *Mytilus galloprovincialis* ha finora dimostrato una bassa prevalenza e non è stata precedentemente segnalata nell'area geografica da noi presa in considerazione.

Barber B.J. (2004). Neoplastic diseases of commercially important marine bivalves *Aquat. Living Resour.*, 17: 449-466.

Ciocan C. & Sunila I. (2005). Disseminated neoplasia in blue mussels, *Mytilus galloprovincialis*, from the Black Sea, Romania. *Mar. Pollut. Bull.*, 50 (11): 1335-1339.

Elston R.A., Moore J.D. & Brooks K. (1992). Disseminated neoplasia of bivalve molluscs. *Rev. Aquat. Sci.*, 6: 405-466.

Mix M.C. (1975). Proliferative characteristics of atypical cells in native oysters (*Ostrea lurida*) from Yaquina Bay, Oregon. *J. Invertebr. Pathol.*, 26 (3): 289-298.

Peters E.C. (1988). Recent investigations on the disseminated sarcomas of marine bivalve molluscs. *Am. Fish. Soc. Spec. Publ.*, 18: 74-92.

PRESENZA CONTEMPORANEA DI GONADI MASCHILI E FEMMINILI IN TROTE IRIDEA D'ALLEVAMENTO: CARATTERIZZAZIONE MORFOLOGICA ED ISTOLOGICA

Francesco D.R., Righetti M., Pastorino P., Varello K., Burioli E.A.V., Pezzolato M., Arsieni P., Maldera O., Bozzetta E., Prearo M.

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

Tra i vertebrati, i pesci mantengono una spiccata plasticità nello sviluppo gonadico, sia perché mostrano differenti adattamenti evolutivi legati alla determinazione del sesso, sia perché sono soggetti ad influenze esterne che possono alterarne il normale sviluppo. Questa caratteristica è stata storicamente sfruttata in acquacoltura, dove per alcune specie è economicamente più conveniente l'allevamento di individui appartenenti ad un solo sesso: un esempio è rappresentato dall'allevamento della trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*), di cui sono allevate a scopo alimentare quasi esclusivamente individui di sesso femminile. I pochi maschi, allevati quasi unicamente come individui destinati alla riproduzione, possono essere ottenuti anche dall'inversione sessuale di femmine tramite la somministrazione di 17α -metiltestosterone nella dieta durante le prime fasi di alimentazione dopo la schiusa.

La condizione in cui vi è la contemporanea presenza di organi in grado di produrre sia gameti maschili che femminili viene denominata ermafroditismo; possiamo distinguere un *ermafroditismo istantaneo o simultaneo*, dove i soggetti presentano gonadi maschili e femminili contemporaneamente, oppure presentano una sola gonade in grado di produrre entrambi i tipi di gameti (*ovotestis*), oppure un *ermafroditismo sequenziale*, talvolta indicato come inversione sessuale, dove i soggetti cambiano sesso nel corso della loro vita; quest'ultima condizione, relativamente frequente nelle specie ittiche, può evolversi dapprima come individui maschi che successivamente si trasformano in femmine, come nel caso dell'orata (proterandria), o viceversa come nel caso della donzella (proteroginia). Inoltre, l'ermafroditismo si può ulteriormente suddividere in *ermafroditismo sufficiente* dove gli organismi sono in grado di riprodursi in autonomia ed *ermafroditismo insufficiente* dove i soggetti devono necessariamente interagire con un altro individuo per garantire la riproduzione. Sebbene l'autofecondazione assicuri ad ogni individuo la possibilità di riprodursi, la condizione dell'ermafroditismo insufficiente a livello evolutivo è quella maggiormente affermata, in quanto permette sempre una variabilità genetica.

Lo scopo del presente lavoro è quello di segnalare diversi casi di *ovotestis* in soggetti adulti di trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*) evidenziati durante attività di campionamento routinaria. Durante la ricerca volta all'individuazione dei geni di resistenza alla lattococcosi, il Laboratorio Specialistico di Ittiopatologia di Torino ha acquistato un lotto di circa 500 trote iridea adulte, del peso medio di circa 350-400 grammi, da un allevamento del Veneto. Nel corso della ricerca, 30 individui sono stati esclusi dalla sperimentazione e quindi destinati all'eliminazione; pertanto sono stati soppressi mediante anestesia profonda con MS-222 ed inviati al laboratorio per la verifica del quadro anatomopatologico e batteriologico routinario. All'apertura della cavità celomatica, in 5 individui (16,7%), fenotipicamente di sesso femminile, è stata riscontrata la presenza di *ovotestis*, sebbene con differenti morfologie, passando da piccoli abbozzi ovarici nel contesto del tessuto gonadico maschile, a vere e proprie forme intermedie con presenza di tessuto ovarico interposto a tessuto testicolare, con struttura ben conformata ed ampia. In un esemplare inoltre si è potuto rilevare la presenza di un *ovotestis* ben conformato nella gonade destra, mentre la gonade di sinistra era costituita da un testicolo completo, ma di forma globulare. Istologicamente le diverse strutture gonadiche apparivano normotipiche.

La presenza in natura di salmonidi con *ovotestis* è già nota, sebbene si tratti di un fenomeno molto raro; in condizioni di allevamento, dopo trattamenti ormonali specifici per la mascolinizzazione invece, sono ampiamente documentati. Le cause pertanto che possono determinare queste alterazioni morfologiche sono da imputarsi all'uso di ormoni per pratiche d'allevamento o in natura, eventualmente per un'esposizione con sostanze inquinanti definite *endocrine disruptor*. Nel caso qui segnalato, visto la provenienza, è molto probabile che la condizione descritta in alcuni esemplari, sia da imputarsi all'assunzione scorretta di 17α -metiltestosterone e che tali soggetti siano rientrati erroneamente in una partita di trote commerciabili.

RISCHI SANITARI DERIVATI DALLE SEMINE DI ITTIOFAUNA IN ACQUE PUBBLICHE: L'ULTIMO CASO

Pastorino P., Fogliani C., Righetti M., Dellerba D., Mignone W.¹, Prearo M.

Laboratorio Specialistico di Ittiopatologia, Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino; ¹Sezione territoriale di Imperia, Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Imperia.

Le immissioni di ittiofauna sono uno strumento comunemente utilizzato dalle Amministrazioni Locali, sia per ricostituire e potenziare il popolamento ittico nelle acque interne, sia per soddisfare le pratiche alieutiche delle associazioni di pescatori sportivi. Tuttavia, l'immissione di animali vivi in un ambiente naturale, comporta sempre un potenziale rischio di introduzione di agenti patogeni potenzialmente dannosi, sia per le popolazioni selvatiche che per gli impianti d'acquacoltura eventualmente insiti sulle aste fluviali oggetto di ripopolamento. Per prevenire questo rischio la normativa vigente prevede delle misure rigide di prevenzione e controllo, ma solamente delle malattie notificabili. Per quanto riguarda invece altri patogeni, la normativa vigente precisa unicamente che gli animali destinati al ripopolamento si devono mostrare “*cl clinicamente sani*” e che devono provenire “*da un'azienda o una zona in cui non si registri un aumento inspiegabile del tasso di mortalità*”. Molto spesso la presenza di alcuni agenti eziologici in forma latente, porta ad una difficoltà nella diagnosi in animali apparentemente sani che, senza un adeguato monitoraggio sanitario, fa aumentare il rischio di introduzione accidentale di patogeni nell'ambiente.

Il caso qui illustrato ha visto l'arrivo, presso il Laboratorio Specialistico di Ittiopatologia di Torino di 17 esemplari di trota fario (*Salmo trutta*) rinvenuti morti in 3 differenti pozze localizzate lungo il corso del torrente Carpasina (comune di Carpasio, IM), situate nelle località “I Carpi”, “Mulino d'Arianna” e “Roccai”. Il fenomeno di mortalità anomala si è verificato nella settimana successiva ad una semina di fauna ittica programmata alla fine del mese di luglio 2016. Numerosi campioni analizzati si presentavano in condizioni di conservazione non idonee per un corretto iter analitico: nei 4 esemplari meglio conservati non è stato possibile individuare alcuna lesione macroscopica a carico della cute e degli organi interni. Il successivo esame batteriologico, effettuato mediante semina diretta su Agar Sangue dal rene anteriore, ha però permesso di isolare in purezza ed in seguito identificare tramite prove biochimiche (sistema API, bioMérieux) e sierologiche (test di agglutinazione rapida, Bionor), la presenza di *Aeromonas salmonicida*, agente responsabile della foruncolosi dei Salmonidi. Da indagini anamnestiche effettuate sul campo, è risultato che nell'allevamento di provenienza delle trote fario immesse non fossero stati registrati fenomeni di mortalità anomala nei periodi immediatamente antecedenti e successivi alla data dell'evento in oggetto, così come nella fauna ittica stanziale nel periodo precedente. Sebbene non sia possibile escludere la presenza in natura del patogeno, il fenomeno di moria appare essersi sviluppato troppo rapidamente per pensare ad un contagio avvenuto nelle acque libere. L'ipotesi più plausibile resta quella che il patogeno fosse presente o in forma latente all'interno dell'allevamento di provenienza (ipotesi suffragabile dall'anamnesi raccolta) o che fosse presente in forma subacuta e non diagnosticata (ipotesi più realistica): in questo modo la tesi che la malattia si sia poi manifestata in modo pesante ed acuto, a seguito dello stress causato agli animali durante le fasi di cattura e trasporto, può essere facilmente avallata. Questo recentissimo caso evidenzia quindi l'importanza dei controlli sanitari e dei monitoraggi periodici e regolari da effettuarsi, sia all'interno degli allevamenti ittici, onde garantire lo stato di salute a tutto tondo dei pesci venduti e immessi nelle acque pubbliche, sia della fauna ittica presente negli ambienti fluviali, per evidenziare eventuali problematiche di natura locale e non d'importazione a causa di operazioni di immissione e/o traslocazione di pesci. In particolare i controlli effettuati sui lotti ittici destinati all'immissione in acque pubbliche dovrebbero essere condotti in un arco di tempo utile ad accertare lo stato sanitario dello stock immediatamente prima del suo rilascio in ambiente e accompagnati da una certificazione che ne comprovi l'esito; questo al fine di prevenire la semina di materiale ittico infetto, impedendo la diffusione di agenti eziologici in grado di colpire gravemente l'ittiofauna.

MONITORAGGIO SANITARIO E AMBIENTALE IN CENTRI ESTETICI CHE UTILIZZANO GARRA RUFa IN PRATICHE DI FISH PEDICURE

Righetti M.¹, Pennazio R.², Gridelli S.³, Serracca L.¹, Fogliini C.¹, Pastorino P.¹, Briata M.P.², Prearo M.¹

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta; ²ASL 2 Savonese, Savona; ³Aquamarina, Gabicce Mare (PU) – Cattolica (RN).

Garra rufa sono piccoli pesci appartenenti alla famiglia dei Ciprinidi, chiamati anche "doctor fish", ampiamente utilizzati sia nel trattamento di malattie come la psoriasi, che in pratiche estetiche come manicure, pedicure e peeling naturale, grazie alla loro capacità di asportare piccole porzioni di pelle senza intaccare gli strati più profondi del derma.

La *fish pedicure* comporta l'utilizzo di pesci vivi: questo ha generato da più parti, preoccupazioni relative al benessere dei pesci, ma soprattutto al potenziale rischio di trasmissione di infezioni all'uomo; inoltre, i metodi convenzionali di disinfezione e sterilizzazione dell'acqua risultano difficilmente applicabili in questi centri estetici che fanno uso di tali pesci.

Poiché questa attività si sta diffondendo in molti Paesi, Italia compresa, si è deciso di attuare un monitoraggio preliminare, ambientale e sanitario, effettuato in due centri estetici che utilizzano i *fish doctor* nelle pratiche estetiche. Sono stati analizzati complessivamente 36 esemplari, sui quali, è stato valutato lo stato sanitario mediante esami anatomopatologico, parassitologico, colturale di primo isolamento e per la ricerca di micobatteri atipici. Dalle diverse vasche invece, sono stati effettuati 60 tamponi per valutare la presenza di eventuali e potenziali patogeni, sia di origine batterica che virale, di interesse nel settore della salute pubblica; più precisamente i tamponi sono stati processati per determinare la carica batterica mesofila, l'eventuale presenza di *Salmonella* spp., di *Listeria monocytogenes*, di *Escherichia coli* β -glucuronidasi, di *Vibrio parahaemolyticus* e *V. cholerae*, di *Staphylococcus* spp., mediante tecniche microbiologiche, oltre che quella di Norovirus, virus dell'Epatite A (HAV) e dell'Epatite E (HEV), mediante tecniche biomolecolari.

Tutte le analisi condotte sui pesci sono risultate negative, compreso la ricerca di micobatteri atipici. I risultati ottenuti sui tamponi hanno messo in evidenza l'assenza di *Salmonella* spp., *L. monocytogenes*, *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae*, Norovirus, HAV e HEV. La carica mesofila totale è stata riscontrata nei diversi campioni con un range tra 330 e 6.500 CFU/cm²; la presenza di *E. coli* β -glucuronidasi è stata rilevata sempre con valori <10 CFU/cm², mentre la presenza di *Staphylococcus* spp. è stata accertata solamente in due campioni con valori di 16,7 e 100 UFC/cm²; in tutti i casi comunque i campioni sono sempre risultati negativi per *S. aureus*.

Sulla base dei risultati ottenuti in questa fase analitica, seppur in modo del tutto preliminare, si può asserire che la valutazione dello stato di salute e di alimentazione dei pesci, compreso lo stato di stress, possono essere efficacemente controllati con le tecniche normalmente in uso presso i laboratori specialistici. Il controllo dei parametri microbiologici ambientali invece, necessitano di una numerosità campionaria maggiore e di una più ampia casistica, proprio per avvalorare i risultati fino a qui ottenuti.

Sicuramente, un'ottimale gestione delle vasche, con un'adeguata pulizia e disinfezione delle pareti e dei filtri, una consona alimentazione dei pesci ed un buon piano di autocontrollo analitico, permette di avere un basso rischio sanitario per la pratica di *fish pedicure*.

Redigere delle linee guida puntuali ed efficaci, effettuare pulizie e disinfezioni costanti e idonee dei locali, delle vasche e dei filtri, attuare un piano di autocontrollo sufficiente alle esigenze del centro, avvalersi di laboratori specialistici per le analisi e avere un sistema di controllo pubblico efficiente sia a livello autorizzativo, sia a livello sanitario, comporta sicuramente un'ulteriore riduzione dei rischi possibili, consentendo da una parte un più ampio utilizzo di queste pratiche estetiche per valorizzare al meglio delle attività produttive, soprattutto in certi contesti geografici o urbanistici e dall'altra una maggiore sicurezza ed elasticità nei controlli per tutelare al meglio sia il benessere animale che la sicurezza del consumatore.

INDAGINE PRELIMINARE SUI FATTORI LIMITANTI L'ALLEVAMENTO DI SPECIE ITTICHE IN UN IMPIANTO DI ACQUACOLTURA A RICIRCOLO (RAS)

Costa A.¹, Fortino L.², Costa A.³, Currò V.³, Gustinelli A.⁴, Quaglio F.⁵, Maccarrone M.⁶, Milano A.⁷

¹Porrizzato S.r.l. Acate (RG); ²Veterinario libero professionista, Siracusa; ³Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia "A. Mirri"- Palermo; ⁴Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Alma Mater Studiorum Università di Bologna; ⁵Dipartimento di Biomedicina Comparata ed Alimentazione, Università di Padova, Legnaro (PD); ⁶Università Campus Bio-Medico di Roma; ⁷Dipartimento Regionale della Pesca Mediterranea, Palermo.

Il RAS (Recirculating Aquaculture System) viene considerato un sistema chiuso che dovrebbe caratterizzarsi per un ridotto rischio di insorgenza di malattie nel materiale ittico allevato e di trasferimento di patogeni alle popolazioni selvatiche, non essendoci alcun tipo d'interazione con l'ambiente circostante.

Con l'obiettivo di aumentare la conoscenza e la documentazione sulla salute dei pesci e la questione del benessere animale nel RAS in scala di produzione, con il coordinamento del Dipartimento Regionale della Pesca Mediterranea è stato avviato un monitoraggio sanitario presso l'impianto dell'azienda Porrizzato. L'azienda è stata registrata nel sistema anagrafico delle imprese di acquacoltura il 23 luglio 2015. Si tratta di un allevamento di acqua dolce a ricircolo idrico in cui si allevano le specie *Morone saxatilis* e *Micropterus salmoides*.

Con lo scopo di monitorare lo stato di salute dei pesci allevati nel RAS nelle diverse fasi di accrescimento sono stati effettuati tre campionamenti, uno in gennaio e due in aprile, per un totale di 12 pesci di cui 4 esemplari di *M. salmoides* e 8 di *M. saxatilis*.

Tutti i pesci sono stati sottoposti ad esame necroscopico, parassitologico e batteriologico secondo procedure di laboratorio standard. Inoltre è stata condotta RT-PCR sui cervelli di tutti gli animali per la ricerca di *Betanodavirus*; porzioni di branchie, cervello ed organi interni sono stati fissati in formalina tamponata al 10% per la conduzione dell'esame istologico e impronte di rene e milza sono state colorate con la metodica di Ziehl Neelsen per la ricerca di Batteri Alcool-Acido Resistenti (BAAR).

Nelle vasche dell'impianto vengono monitorati giornalmente i principali parametri dell'acqua quali ossigeno, temperatura, pH, settimanalmente ammoniaca, nitriti, nitrati, periodicamente conta batterica, solidi sospesi e diossido di carbonio.

Ad oggi le analisi effettuate sui pesci allevati non hanno rilevato la presenza di agenti di malattie trasmissibili, ad eccezione di lievi infestazioni branchiali sostenute da monogeni Dactylogyroidea, sebbene i risultati ottenuti siano da considerarsi preliminari nell'ambito di un'indagine temporalmente più estesa e numericamente più significativa che si protrarrà nel prossimo futuro. L'esame istologico in alcuni esemplari ha messo in evidenza a livello branchiale la presenza di rare aree otticamente vuote riferibili ad emboli gassosi a livello del circolo ematico negli animali colpiti, che potrebbero essere prodromi all'insorgenza di malattia da gas e rappresentare un fattore limitante nel riutilizzo dell'acqua nei RAS. La malattia da gas è causata da una sovrasaturazione di gas disciolti nell'acqua. In generale il RAS, secondo quanto osservato in queste prime esperienze di accrescimento con *M. salmoides* e *M. saxatilis*, sembrerebbe garantire il mantenimento di una buona condizione di allevamento, fatto salvo la valutazione dei possibili fattori di insorgenza della malattia da gas e tenendo comunque presente un fattore estremamente critico da un punto di vista gestionale quale l'elevato consumo di energia richiesto da questo sistema di allevamento.

VALUTAZIONE DI UNA POSSIBILE GAMETOGENESI IN INDIVIDUI TRIPLOIDI DI OSTRICA *CRASSOSTREA GIGAS*. RISULTATI DEL PRIMO ANNO DI STUDIO

Burioli E.A.V, Varello K., Gorla A.¹, Bozzetta E., Prearo M.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino; ¹ Compagnia Ostricola Mediterranea, San Teodoro (OT).

La triploidia, ottenuta tramite manipolazione del corredo cromosomico, è stata ideata nell'ostrica concava *Crassostrea gigas* per rispondere alle richieste dei consumatori, fornendo anche in estate un prodotto non lattiginoso, poiché sterile. Nei primi anni 90, la triploidizzazione era indotta chimicamente con l'ausilio di citocalasina B. L'evidenza dell'alta tossicità di questo composto per l'uomo ha poi portato al divieto del suo utilizzo per la produzione diretta di larve triploidi e allo sviluppo di nuove metodiche di produzione che prevedono l'impiego di riproduttori maschi tetraploidi incrociati con femmine diploidi. La maggior parte degli organismi eucarioti possiede, a livello delle cellule somatiche, un corredo cromosomico composto da un numero n di paia di cromosomi omologhi (cariotipo $2n$), variabile in base alla specie di provenienza e uguale a 10 nell'ostrica concava. Diversamente, gli organismi triploidi ne contano tre copie (cariotipo $3n$). La poliploidia non è esclusivamente il risultato di manipolazione da parte dell'uomo, ma è comunemente riscontrata in natura: circa la metà delle specie vegetali possiede questa caratteristica; è tuttavia più rara negli animali, ma si può osservare in alcune specie come lo storione. Dalla triploidia, gli allevatori hanno tratto un duplice vantaggio in termini di produttività. In effetti, ha permesso di eliminare i problemi di stagionalità della vendita dovuti ad un degrado delle proprietà organolettiche durante il periodo riproduttivo ed induce un aumento consistente della crescita somatica ed un miglioramento della qualità grazie ad un maggiore accumulo di glicogeno nei tessuti di riserva. Tuttavia ultimamente, questi miglioramenti produttivi sono rimessi in questione di fronte ad una probabile maggiore suscettibilità degli individui triploidi al patogeno *Vibrio aestuarianus*, evidenziata durante il progetto DIMORPLO della Regione Normandia - Francia (Dinamica delle Mortalità in funzione della PLOidia). In occasione di questo studio si è inoltre evidenziata in molti individui triploidi la presenza di una gametogenesi, in alcuni casi anche cospicua, confermando le osservazioni di Jouaux *et al.* (2010) che riportavano la presenza di una proporzione di animali, chiamati individui α , in grado di sviluppare numerosi gameti maturi, diversamente dagli individui β , con gametogenesi bloccata. Il fenomeno era già stato descritto in precedenza, ma secondo Normand *et al.* (2008), il numero di gameti prodotti era molto contenuto, al punto che il rapporto coordinato da Bernard Chevassus-au-Louis del 2009 sul rischio ambientale, aveva escluso l'ipotesi di una possibile proliferazione di ostriche $3n$ e $4n$ nelle aree ostricole. In questo contesto, uno studio di valutazione della gametogenesi, della durata di un intero ciclo produttivo di due anni, è stato intrapreso su una popolazione di ostriche triploidi provenienti da una hatchery francese e mantenute in allevamento da maggio 2014 presso lo stagno di San Teodoro (OT), regolarmente afflitto da eventi di mortalità in ostriche adulte. In seguito, riportiamo i risultati del primo anno di studio. Sono stati prelevati, tra fine maggio 2015 e novembre 2015, un totale di 140 individui adulti di ostrica concava *Crassostrea gigas*. Il campionamento mensile prevedeva il prelievo di 10 individui diploidi e 10 triploidi. Dopo il loro arrivo presso il laboratorio, è stata realizzata e fissata in soluzione di Bouin per 48 ore una sezione trasversale delle parti molli dell'animale prima di procedere all'esame istologico eseguito su preparati colorati tramite ematossilina-eosina. *C. gigas* è una specie ermafrodita sequenziale. La valutazione dello stadio di maturazione gonadica tramite M.O. di individui femmine, maschi e stadi indeterminati (giovani o riposo riproduttivo) è stata definita in 5 stadi di sviluppo (da 0 a IV) e si è basata sulla classificazione di Mann (1979) e di Lango-Reynoso (2000). Negli individui diploidi si è osservata una *sex-ratio* di 1:1. A fine maggio lo sviluppo gonadico raggiunge lo stadio III/IV. Il tessuto germinale occupa una parte preponderante del campo: la vitellogenesi è completata, il diametro medio degli ovociti raggiunge in media 46 μm ed i follicoli maschili comprendono un elevatissimo numero di spermatozoi maturi. Fino a settembre, si osservano emissioni in atto da parte di entrambi i sessi. Delle alterazioni della gametogenesi sono state evidenziate in tutti gli animali triploidi. Più della metà degli individui presentava un ermafroditismo simultaneo con l'anomala presenza contemporanea di gameti maschili e femminili allo stadio III/IV e solo in 7% dei casi si osservava un tessuto riproduttivo indifferenziato. La capacità gametogenica è stata quindi osservata, ma non quella di rilascio degli ovociti, al contrario di quanto osservato per gli spermatozoi spesso presenti nei gonodotti. Tuttavia il numero di gameti è risultato estremamente esiguo permettendoci di classificare come individui β tutti gli animali campionati. I dati raccolti durante il primo anno di studio, contraddicono le osservazioni effettuate nel 2010 in Normandia dove si descriveva il 25% di individui α .

PROPRIETA' IMMUNOSTIMOLANTI DI PROTEC™ IN TROTA IRIDEA (*ONCORHYNCHUS MYKISS*)

Bulfon C.¹, Pacorig V.¹, Sarti M.², Luzzana U.², Galeotti M.¹, Volpatti D.¹

¹Sezione di Patologia Veterinaria, Dipartimento di Scienze AgroAlimentari, Ambientali e Animali, Università degli Studi di Udine; ²Skretting, 37060 Mozzecane (VR)

L'utilizzo di alimenti funzionali consente di migliorare lo stato di salute dei pesci allevati, incrementare le performance di crescita, salvaguardare la morfologia del tratto gastrointestinale e l'equilibrio della microflora intestinale, aumentare la resistenza alle malattie infettive (Newaj-Fyzu & Austin, 2015).

Questo studio è stato finalizzato ad indagare *in vitro* gli effetti immunostimolanti del prodotto commerciale Protec™ (Skretting, Mozzecane VR) sull'attività di "burst respiratorio" e sulla proliferazione dei leucociti di trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*). Lo studio è preliminare ad una prova *in vivo* attualmente in corso finalizzata a valutare l'effetto di Protec™ sulla risposta immunitaria della trota.

L'attività di "burst respiratorio" dei leucociti purificati da rene anteriore di trota (60-100 g, n=6) incubati in micropiastra per 90 minuti con Protec™ (tal quale o sonicato) LPS, zymosan (160 µg/ml) e PMA (2.5 µg/ml, controllo positivo) è stata misurata mediante chemiluminescenza con luminolo. La proliferazione dei leucociti (n=6) incubati per 72 ore con Protec™ (tal quale o sonicato), LPS, zymosan (160 µg/ml e 20 µg/ml) e PHA (20 µg/ml, controllo positivo) è stata valutata mediante metodo colorimetrico con MTT (Bulfon *et al.*, 2016).

La prova *in vivo*, condotta presso una trota coltura intensiva del Friuli Venezia Giulia, contempla un gruppo di trote di controllo (peso medio iniziale 5 g) alimentato con mangime commerciale (Optiline HE, Skretting, Mozzecane VR) e un gruppo di trote alimentato per 10 settimane con Protec™. Il razionamento verrà adattato progressivamente alla crescita dei pesci, secondo quanto indicato dalla ditta mangimistica. Al termine del trial, le trote verranno sottoposte a prelievo di sangue e rene anteriore previa anestesia con MS222 (100 mg/l), per la valutazione dell'attività del lisozima nel siero e dell'attività di "burst respiratorio" dei leucociti (Bulfon *et al.*, 2016).

I risultati ottenuti *in vitro* dimostrano che Protec™ è in grado di stimolare significativamente l'attività di "burst respiratorio" e la proliferazione dei leucociti di trota iridea ($P \leq 0,05$). Specificatamente, Protec™ sonicato induce una risposta di "burst respiratorio" paragonabile a quella prodotta dagli stimoli LPS e zymosan, mentre Protec™ non trattato induce una risposta molto maggiore e paragonabile a quella determinata dalla stimolazione delle cellule con PMA usato come controllo positivo. Dall'altro lato, la proliferazione dei leucociti stimolati con Protec™ sonicato (20 µg/ml) è risultata significativamente maggiore rispetto a quella delle cellule di controllo e delle cellule stimolate con zymosan, paragonabile a quella delle cellule stimolate con PHA e LPS.

Gli effetti della somministrazione di Protec™ sulla risposta immunitaria della trota iridea verranno discussi.

Bulfon C., Bongiorno T., Messina M., Volpatti D., Tibaldi E. & Tulli F. (2016). Effects of *Panax ginseng* extract in practical diets for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) on growth performance, immune response and resistance to *Y. ruckeri*. *Aquac. Res.*, in press. DOI: 10.1111/are.13072;
Newaj-Fyzu A. & Austin B. (2015). Probiotics, immunostimulants, plant products and oral vaccines, and their role as feed supplements in the control of bacterial fish diseases. *J. Fish Dis.*, 38:937-955.

BENESSERE, SALUTE ED INDIVIDUALITÀ IN AQUACOLTURA: IL PROGETTO WIN-FISH

Fiocchi E.¹, Manfrin A.¹, Winberg S.², Bégout M.L.³, Roque A.⁴, Villarroel M.⁵, Lembo G.⁶, Gesto M.⁷

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, CSI Adria (RO); ²Uppsala Universitet, Svezia; ³IFREMER, Francia; ⁴IRTA, Spagna; ⁵UPM, Spagna; ⁶COISPA, Italia; ⁷DTU Aqua, Danimarca.

Nell'acquacoltura moderna, i pesci sono esposti a diversi stress inerenti all'allevamento che possono comprometterne la salute e il benessere. Allo stesso tempo, sono in aumento gli studi per chiarire le reazioni causate dallo stress, che sono differenti da specie a specie ed individuali, e possono essere incluse nel concetto di benessere animale. Le reazioni individuali dei diversi soggetti sottoposti a stress spesso possono essere individuate come forma di stress coping styles (SCS). Tale risposta agli stimoli stressori può causare nei pesci reattività, aggressione e la tendenza alla cronicizzazione; infatti, spesso viene trovata una relazione negativa con i livelli di cortisolo nel plasma e solitamente è associata a una maggiore suscettibilità alle malattie causata da una diminuzione della risposta immunitaria. L'obiettivo principale del progetto WIN-FISH è di investigare la rilevanza dell'individualità dei pesci per valutarne il benessere e le prestazioni in diverse condizioni di allevamento.

Il consorzio WIN-FISH è composto da 6 partners provenienti da 5 paesi europei: saranno validati gli indicatori fisiologici, comportamentali e di benessere nelle specie di orata, branzino e trota a livello individuale e di gruppo.

Questi studi genereranno nuove informazioni riguardanti le risposte a fattori ambientali e conoscenze che potranno essere applicate per migliorare le pratiche di allevamento e di gestione. Il sistema moderno di ricircolo in acquacoltura (RAS), connesso con diversi fattori di stress come una maggiore densità di allevamento e i parametri della qualità dell'acqua, possono influenzare il benessere dei pesci.

In WIN-FISH, in gruppi di orate e branzini allevati a diverse densità, saranno monitorati gli stati di salute, benessere e produzione correlati agli effetti del RAS. Al fine di tener conto delle variazioni individuali, questi studi saranno effettuati su pesci a cui è già stato eseguito uno screening per gli SCS. Allo stesso modo effetti sulla salute, benessere e produzione saranno ulteriormente approfonditi nell'orata, analizzando diversi biomarcatori di stress utilizzando tecniche di biologia molecolare ed immunoistochimica.

Ci si soffermerà anche sull'ambiente di allevamento: infatti è noto che, in generale, un arricchimento ambientale ha effetti positivi sul benessere degli animali. WIN-FISH indagherà sulle conseguenze dell'arricchimento ambientale nella trota in relazione ai differenti SCS.

Nel tentativo di generare marcatori genetici per l'allevamento selettivo di salmone, un'ampia analisi di associazione del genoma verrà eseguita su questa specie con SCS divergenti, concentrandosi su pesci proattivi diversi per comportamento aggressivo.

Infine, anche zebrafish verrà utilizzato come modello per acquisire ulteriori conoscenze sui meccanismi alla base degli SCS e del comportamento aggressivo degli animali.

DETERMINAZIONE DEL CONTENUTO IN METALLI NEI PRODOTTI D'ACQUACOLTURA: UN CASO STUDIO

Squadrone S., Pastorino P., Prearo M., Serracca L., Burioli E.A.V., Stella C., Foglini C., Ercolini C., Abete M.C.

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

L'acquacoltura sta assumendo un ruolo portante nel soddisfare la domanda di mercato che si orienta sempre più verso i prodotti ittici, prendendo in considerazione la sostenibilità ambientale, l'occupazione e soprattutto la sicurezza alimentare. Quando si focalizza l'attenzione sui rischi di natura chimica nei prodotti ittici, la presenza di metalli permane ancora oggi uno tra i più rilevanti per la sicurezza alimentare, ma si può ripercuotere anche sulle condizioni di salute dei soggetti allevati. Le informazioni sulla presenza di metalli traccia nei prodotti d'acquacoltura sono piuttosto scarse. Oltre alla loro presenza naturale nell'ecosistema acquatico, dovuta alla geochimica dell'area, un'altra possibile fonte deriva dall'impatto antropogenico: un esempio è rappresentato dal rame che viene utilizzato anche nei prodotti antivegetativi (nella forma di ossido di rame) per proteggere le reti e le imbarcazioni dal biofouling. Inoltre, gli stessi mangimi impiegati nella dieta delle specie ittiche, spesso vengono arricchiti con elementi essenziali quali ferro, manganese, cobalto o cromo che contribuiscono ad arricchire il tenore in metalli nel muscolo del pesce. Altri metalli definiti non essenziali come arsenico, cadmio, mercurio e piombo hanno come caratteristica comune la tossicità a lungo termine, che si manifesta nell'uomo con effetti tossici anche di notevole gravità. Per tale motivo, il contenuto in metalli derivanti dal consumo dei prodotti ittici deve essere attentamente valutato in funzione del rapporto rischio/beneficio, soprattutto nei confronti delle fasce di popolazione particolarmente vulnerabili, come i bambini, gli anziani, le donne in gravidanza ed i grandi consumatori di prodotti ittici. Gli obiettivi di questo studio prevedono: 1) - la determinazione della concentrazione di alluminio (Al), antimonio (Sb), arsenico (As), berillio (Be), cadmio (Cd), cerio (Ce), cobalto (Co), cromo (Cr), ferro (Fe), manganese (Mn), mercurio (Hg), molibdeno (Mo), lantanio (La), nichel (Ni), piombo (Pb), rame (Cu), selenio (Se), stagno (Sn), tallio (Tl), vanadio (V) e zinco (Zn) in 25 esemplari di branzino (*Dicentrarchus labrax*), 25 cozze (*Mytilus galloprovincialis*) e 25 ostriche del Pacifico (*Crassostrea gigas*) provenienti da impianti di acquacoltura off-shore situati nel Golfo di La Spezia (Liguria); 2) - la verifica della conformità con i livelli massimi di Hg, Cd e Pb stabiliti dal Regolamento Europeo n. 1881/2006 e successive modifiche; 3) - l'analisi dei potenziali rischi per la salute umana associati al consumo di prodotti d'acquacoltura. Dai risultati è emerso che le concentrazioni dei metalli hanno mostrato una grande variabilità all'interno delle tre specie; i valori più elevati dei metalli non essenziali As e Cd sono riscontrabili nelle ostriche, mentre i livelli più alti di Al, Pb e V nei mitili. Gli elementi essenziali Cu, Mn e Zn sono più alti nelle ostriche, mentre livelli di Fe, Cr, Ni, Se, Co e Mo risultano più elevati nei mitili. I branzini, invece, presentano le concentrazioni più basse per tutti gli oligoelementi. I livelli di cerio e di lantanio sono più elevati nei mitili rispetto alle ostriche, ma non rilevabili nei branzini. I valori massimi fissati dalla regolamentazione europea per il Hg, Cd e Pb non sono mai stati superati nei campioni di tutte le specie esaminate. I risultati ottenuti indicano chiaramente come per i pesci la fonte principale di assunzione di metalli è data dall'alimento rispetto l'ambiente, il quale rappresenta un elemento esogeno all'ecosistema, mentre per i molluschi l'ambiente costituisce la fonte principale di possibile contaminazione e quindi anche l'alimento risente direttamente dell'influenza della contaminazione ambientale. Infine, è stata calcolata la stima delle assunzioni giornaliere (EHDIs) per tutti gli elementi analizzati, confrontandola poi con la dose giornaliera e settimanale tollerabile (TDI/TWI) proposta dall'EFSA. Il nostro studio ha confermato come i molluschi contribuiscano all'assunzione di molti elementi traccia e che il loro eccessivo consumo potrebbe superare i TDI di alcuni metalli. Le categorie di persone più vulnerabili quali gestanti o bambini dovrebbero prestare particolare attenzione al consumo di bivalvi, considerando che il consumo stimato non include il contributo derivante da altre fonti di contaminazione a cui la popolazione potrebbe essere eventualmente esposta.

ABSTRACT

WORKSHOP

S.I.P.I.

**CRITICITÀ SANITARIE DI SPECIE ITTICHE
EMERGENTI O RIEMERGENTI ALLEVATE
IN ACQUA DOLCE**

L'ALLEVAMENTO DEL CARPIONE DEL LAGO DI GARDA (*SALMO CARPIO*): CRITICITA' ED OPPORTUNITA'

Lunelli Fernando

F.E.M.-CTT Dipartimento Servizi Tecnologici e Sperimentazione, Unità Acquacoltura e Idrobiologia

Il Carpione del Lago di Garda è un salmonide strettamente endemico del Lago di Garda, prevalentemente planctofago, notoriamente pelagico e che predilige le acque profonde del Garda durante i due periodi riproduttivi. Probabilmente tali peculiarità garantiscono l'instaurarsi di una efficace barriera riproduttiva naturale nei confronti di altri salmonidi simpatrici e interfecondi. Tale specie è considerata in pericolo critico di estinzione dall'Unione Mondiale per la Conservazione della Natura (IUCN Red List 2016). La specie fino al 2015 era oggetto di una forte pressione di pesca praticata dai pescatori professionisti. Ora la pesca è vietata per 5 anni nell'ambito territoriale delle provincie di Verona e Brescia, mentre nella parte trentina verrà vietata a breve. Varie sono le ipotesi riguardo le cause della possibile minaccia d'estinzione (inquinamento delle acque, pesca eccessiva, pesca illegale, competizione o predazione da parte di specie aliene) ma non sono mai state affrontate seriamente dagli Enti competenti in materia di pesca. Molto si è scritto negli ultimi secoli su questa specie ma rari sono gli articoli che contengono dati originali. Le azioni da intraprendere secondo la IUCN sono le seguenti: biologia e ecologia, status dell'habitat, misure di conservazione, reintroduzione. Assecondando quanto evidenziato dalla IUCN, nel 2008 la F.E.M. ha avviato il progetto "Carpiongarda", focalizzando l'interesse scientifico sulla biologia riproduttiva, lo status dell'habitat riproduttivo, l'allevamento e la reintroduzione.

Le indagini e gli approfondimenti riguardo la biologia e lo status dell'habitat riproduttivo naturale hanno evidenziato che tutti i siti di frega sono potenzialmente funzionali. Nei siti riproduttivi, ampiamente visitati nel febbraio 2010 e filmati mediante un ROV (sottomarino a comando remoto) munito di telecamere, non sono mai stati trovati esemplari di Carpione in fase riproduttiva mentre sono stati rinvenuti potenziali predatori come la bottatrice (*Lota lota*) e un'altra specie non riconosciuta simile ad un Ghiozzo.

L'attività allevativa del Carpione è iniziata nel febbraio 2006 in collaborazione con il dottor Ivano Confortini della Provincia di Verona. Nell'incubatoio di Bardolino è stata fatta la prima riproduzione sperimentale da esemplari selvatici. Il novellame così ottenuto è rimasto nell'impianto ittogenico fino a novembre 2007 e successivamente trasferito presso l'impianto di quarantena di Riva del Garda. Dopo le opportune verifiche sanitarie, l'anno successivo il piccolo parco riproduttori è stato trasferito presso il centro ittico della F.E.M. a S. Michele all'Adige dove è iniziato l'allevamento intensivo. Ora l'attività è stata parzialmente trasferita in un secondo impianto ittico in Valsugana gestito dal Consorzio Trentino Piscicoltura.

Fin dall'inizio l'allevamento intensivo del Carpione ha evidenziato numerose problematiche da risolvere. Aspetti tecnici non semplici da risolvere data la totale assenza di notizie bibliografiche utili. Tra le problematiche più urgenti vi erano la mancanza di informazioni sulle caratteristiche qualitative dell'acqua da utilizzare per l'allevamento, per l'incubazione delle uova ed in fase di prima alimentazione. Altro problema era la scarsa compatibilità dell'alimento commerciale disponibile con le esigenze metaboliche della specie abituata a predare l'alimento naturale vivo (zooplankton, piccoli crostacei e probabilmente piccoli pesci) qualitativamente molto differente dall'alimento disponibile sul mercato. L'aspetto qualitativo e la composizione centesimale dell'alimento per riproduttori è stato fin dall'inizio un problema rilevante in quanto le prime partite di uova prodotte dalle fattrici non erano di buona qualità, spesso non fecondabili oppure non in grado di portare a buon fine l'incubazione. Aspetto particolarmente critico delle prime settimane di vita della larva era la grande mortalità e la lenta crescita degli avannotti durante il primo anno di vita. Attualmente tali problematiche sono state in gran parte risolte e appare in modo sempre più evidente che l'allevamento intensivo del carpione è un'opportunità non solo per le possibili ricadute commerciali ma anche per la conservazione della specie nell'ambiente naturale. A tal proposito alcune prove di immissione di uova embrionate in scatole Vibert in un sito di frega alla profondità di circa 120 metri hanno dato ottimi risultati riguardo la possibile sopravvivenza delle uova e la schiusa.

ALLEVAMENTO DEI PERCIDI, ATTUALITÀ E PROSPETTIVE

Mauro Vasconi

Dipartimento di Scienze Veterinarie per la Salute, la Produzione Animale e la Sicurezza Alimentare Università degli Studi di Milano

Con il termine Percidi si intendono specie ittiche d'acqua dolce appartenenti alla famiglia dei percidae. In Italia sono naturalmente presenti tre specie ittiche appartenenti a questa famiglia: il Pesce Persico (*Perca fluviatilis*), è l'unica specie autoctona delle acque italiane mentre il Lucioperca (*Sander lucioperca*) e l'Acerina (*Gymnocephalus cernuus*) sono due specie esotiche introdotte nel corso del 900 in Italia e che hanno come areale di provenienza l'Europa centrale. Il Persico e il Lucioperca godono di un elevato interesse commerciale. Il consumo di queste specie ittiche in Italia si concentra prevalentemente nelle aree adiacenti ai luoghi di pesca, dove molto spesso vengono usati prevalentemente dal settore della ristorazione. È più difficile ritrovare persico e lucioperca nelle grandi città o in luoghi lontani dai laghi del nord o del centro Italia. La produzione italiana da cattura non è in grado di soddisfare la domanda interna. Oltre al prodotto derivante dalla pesca nazionale sul mercato italiano arrivano dei quantitativi importanti di filetti di pesce persico, e in maniera minore di lucioperca, proveniente dal Nord ed est Europa, dove queste specie vengono pescate anche nelle acque salmastre a bassa concentrazione salina che si trovano adiacenti alle rive del Mar Baltico. Le importazioni coinvolgono sia pesce intero, sia in forma di filetti, freschi o congelati. Esiste quindi una fetta di mercato che potrebbe venire occupata da prodotto allevato, in caso in cui esso avesse un prezzo paragonabile con quello del prodotto di pesca.

L'allevamento dei percidi è in fase di sviluppo. In Europa centro orientale esso viene praticato in forma estensiva in stagni, ove sono presenti anche gli organismi di cui questi pesci si nutrono. Questo tipo di allevamento ha lo svantaggio di necessitare di un lungo periodo per il raggiungimento della taglia commerciale, in quanto nei mesi invernali, con le temperature delle acque che scendono al di sotto dei 10 °C, il ritmo di crescita di persico e lucioperca rallenta notevolmente. Con lo scopo di ovviare a questa problematica è stata sperimentata la possibilità di allevare queste specie in impianti a ricircolo, dove è possibile mantenere costante durante tutto l'anno la temperatura dell'acqua, tenendola nei valori di optimum termico per la specie. Partendo da animali svezzati di 3 g la taglia commerciale per il pesce persico (130-150 g) può essere raggiunta in nove mesi di allevamento quando i pesci sono allevati a 24°C. La taglia commerciale del lucioperca (800-1000g) viene raggiunta in 12 mesi con temperatura dell'acqua di 26°C. Dal punto di vista alimentare il crescente interesse presente nei paesi del centro e nord Europa circa l'allevamento di persico e lucioperca ha spinto le case mangimistiche, supportate dal mondo della ricerca, alla formulazione di diete finalizzate specificatamente a queste specie. Mediamente un mangime per persico e lucioperca ricalca la formulazione di una dieta ottimizzata per specie carnivore e contiene un elevato tenore proteico (50-55%) e un medio contenuto lipidico (12-18%). Per quello che riguarda l'aspetto riproduttivo queste specie si possono riprodurre in cattività sia con tecniche di stimolazione ormonale, sia ricreando l'ambiente adatto alla riproduzione, ovvero inserendo in vasca i supporti su cui le specie abitualmente depongono le uova. Fondamentale per ottenere la riproduzione è la anche corretta gestione del termo e fotoperiodo in quanto lo sviluppo gonadico comincia solamente se gradualmente si portano i riproduttori ad una temperatura di 6°C e li si mantiene a questa temperatura per 4-5 settimane. Contemporaneamente il fotoperiodo deve essere portato L:D 16:8 a L:D 8:16, mimando le condizioni invernali. Con il rialzarsi delle temperature e il prolungarsi delle ore di luce avverrà la deposizione, solitamente a una temperatura dell'acqua di 14°C con un fotoperiodo 12:12. Grazie a queste tecniche è stato possibile ottenere la riproduzione di queste specie anche al di fuori della stagione riproduttiva naturale. L'allevamento larvale si basa sulla somministrazione di alimento vivo, costituito principalmente da nauplii di *Artemia salina*. Alcuni allevatori utilizzano anche come primo alimento il rotifero allevato in culture algali. Risulta fondamentale durante le prime fasi di allevamento la selezione per taglia fatta ad intervalli regolari in quanto si verificano episodi di grandi difformità di crescita che possono portare a importanti tassi di cannibalismo. Altra problematica riscontrata nelle avannotterie che si occupano di queste specie è la presenza di esemplari che mostrano delle deformità ossee e che non insufflano la vescica natatoria.

ALLEVAMENTO E PRINCIPALI PATOLOGIE DEGLI STORIONI

Pedron C.

Storione Ticino Società Agricola s.s. – Cassolnovo (PV)

Gli storioni sono pesci ossei che appartengono alla sottoclasse dei condrostei ed all'ordine degli *Acipenseriformes*. A tale ordine appartengono 2 famiglie: quella degli Acipenseridi e quella dei Poliodontidi (o pesci spatola), per un totale di 27/28 specie differenti, alle quali vanno aggiunte anche svariate tipologie di ibridi interspecifici.

Sono animali molto antichi, dato che la loro comparsa risale a circa 200 milioni di anni, e sono presenti in natura esclusivamente nell'emisfero boreale. Il loro comportamento è di tipo potamodromo o, soprattutto, anadromo: migrano cioè sempre a ritroso in acque dolci per riprodursi, mentre compiono la maggior parte del loro ciclo biologico in acque più a valle (dolci o più o meno salate).

Nell'ambito della specie, non esiste un dimorfismo sessuale con caratteristiche univoche, cosa che ha costretto allo sviluppo di tecniche di sessaggio in allevamento, dato il diverso destino dei maschi (produzione della sola carne, con ciclo di allevamento più breve) rispetto alle femmine (caviale e, secondariamente, carne).

Pur con differenze legate alla specie ed alla localizzazione, tutti gli storioni sono da considerare a rischio più o meno grave di estinzione nel proprio habitat naturale, per cui sono sottoposti a programmi di tutela. Le principali, ma non le uniche, istituzioni internazionali che si occupano di questo aspetto sono:

- IUCN (International Union for the Conservation of Nature): fondata nel 1948 con sede in Svizzera a Gland, vicino a Ginevra. Si tratta di una istituzione scientifica che agisce come organo consultivo e propositivo
- CITES (Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora): stipulata a Washington nel 1973, su input dell'IUCN. E' un accordo, vincolante per chi vi aderisce, che regola il commercio internazionale delle specie considerate a rischio di estinzione. E' inquadrata nelle attività ONU per l'ambiente (UNEP)
- WSCS (World Sturgeon Conservation Society) nata nel 2003 con sede in Germania. Si tratta di un forum scientifico internazionale focalizzato esclusivamente sulla tutela dello storione e che si occupa attivamente di studi ed iniziative volte alla tutela ed all'incremento degli storioni sia in ambito naturale sia di allevamento

Erodoto indica che già nel 2.500 a.C. era in uso la pesca e la lavorazione degli storioni da parte dell'uomo, mentre, per quanto riguarda la storia dell'allevamento vero e proprio, i primi tentativi vanno fatti risalire a circa 150 anni fa, questo contemporaneamente in Unione Sovietica (*Acipenser ruthenus*), in Germania (*Acipenser sturio*) e negli Stati Uniti (*Acipenser fulvescens*) con l'utilizzo di riproduttori selvatici per ottenere forme giovanili che venivano poi reintrodotti in natura. L'interesse fu però mantenuto vivo quasi esclusivamente in Unione Sovietica e da qui si è poi diffuso in tutto il mondo. Per quanto riguarda la storia dell'allevamento in Italia, si può affermare che le prime basi furono poste intorno agli anni '80 del secolo scorso.

Per l'anno 2014 la FAO indica una produzione globale da acquacoltura di 88.576 ton ed un pescato di 273 ton. In Italia l'API indica per lo stesso anno una produzione da allevamento di 2.000 ton. Sempre nel 2014 la produzione mondiale di caviale di allevamento è stimata in 290 ton. Molte sono le specie ed i paesi interessanti all'allevamento, ma il ruolo di leader, sia per il caviale sia per la carne, spetta alla Cina.

Per quanto riguarda la patologia, si è sempre ritenuto che gli storioni fossero interessati da un numero piuttosto limitato di malattie e che fossero quindi dei soggetti piuttosto resistenti ad esse. Nel tempo tale affermazione non è parsa rivelarsi poi così veritiera, dato che l'incremento dell'importanza e dei volumi di tale allevamento ed un parallelo aumento dell'interesse e dell'approfondimento scientifico hanno portato ad un aumento delle segnalazioni in questo campo,

sempre tenendo conto delle possibili differenze legate alla specie. Gli studi in questo settore, in particolare per quanto riguarda i virus, hanno avuto la loro culla negli Stati Uniti, ma si sono via via diffusi anche nelle altre nazioni interessate alla storionicoltura.

Applicando una suddivisione su base eziologica, le principali patologie degli storioni possono essere così schematizzate:

Patologie da cause non identificate:

- presenza di gas nel tratto intestinale e/o nella vescica natatoria
- sindrome cachettica o da malnutrizione
- rene policistico
- presenza di formazioni nodulari similtumorali con presenza di calcificazioni distrofiche
- mortalità in fase di riassorbimento delle uova

Patologie da cause chimico-fisiche:

- ingestione di corpi estranei
- lesioni da eccessiva esposizione alla luce solare
- traumatismi con lesione/rottura della colonna vertebrale
- lesioni da alterata composizione dell'acqua
- lesioni da corrente elettrica

Patologie da cause parassitarie:

- Protozoi: *Tricodina* spp., *Epistylis* spp. ed Amebe
- Micosi
- Crostacei copepodi: appartenenti ai generi *Argulus*, *Ergasilus* e ad altri

Patologie da cause batteriche:

Fra le principali patologie batteriche, sia primarie sia secondarie, si segnalano:

- Flavobatteriosi
- Setticemie batteriche:
 - MAS: setticemie da *Aeromonas mobilis*
 - *Yersinia ruckeri*
 - *Streptococcus dysgalactiae* e *Streptococcus dysgalactiae* ssp. *equisimilis*
 - *Pseudomonas fluorescens*
 - *Plesiomonas shigelloides*:
 - *Citrobacter*, *Shewanella* ed altri (rilevanza non sempre evidente)
- Epiteliocisti (malattia branchiale proliferativa da Chlamydia-like)
- Micobatteriosi: localizzate e sistemiche

Patologie da cause virali:

- Papova-like virus
- Rhabdovirus
- Adenovirus
- Herpesvirus
- Irido ed irido-like virus (superfamiglia NCLDV)

Si segnala inoltre che alcune specie di storioni possono, in determinate condizioni, ricoprire il ruolo di vettori per virus di altre specie di pesci, quali la Setticemia emorragica virale (VHS) e la Necrosi ematopoietica infettiva (IHN).

Similmente a quanto accade per l'allevamento, gli storioni presentano degli aspetti peculiari anche nel campo della diagnosi, della terapia e della profilassi delle patologie.

RIPRODUZIONE ARTIFICIALE DI ANGUILLA EUROPEA: UN ESPERIMENTO DI SUCCESSO

Mordenti O.¹, Casalini A.¹, Emmanuele P.¹, Parmeggiani A.¹.

¹Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Alma Mater Studiorum Università di Bologna, Cesenatico (FC);

L'anguilla europea (*Anguilla anguilla*) dal 2007 è entrata nella lista rossa delle specie a rischio (IUNC) ed il Regolamento Ce n.1100 del 18 settembre 2007 definendo la popolazione dell'anguilla in forte diminuzione, ha istituito misure per la ricostituzione dello stock europeo, secondo le linee guida per la stesura dei Piani di gestione nazionale.

A questo riguardo, dal 2010 il Corso di Laurea in Acquacoltura ed Igiene delle Produzioni Ittiche di Cesenatico ha avviato le prime sperimentazioni sulle popolazioni selvatiche di anguilla dell'Alto Adriatico al fine di individuare una metodica riproduttiva in cattività che avrebbe ricadute applicative sia in ambito protezionistico (programmi di ripopolamento) che nel settore zootecnico (riduzione degli acquisti sul mercato di giovanili selvatici per dare avvio all'allevamento).

Tre anni di studio sono stati necessari per individuare ed affinare una tecnica di riproduzione artificiale non invasiva ed articolata che avviene, in massima sintesi, attraverso il controllo dei principali parametri ambientali (fotoperiodo, intensità luminosa, temperatura e salinità dell'acqua) associato ad un programma di stimolazione ormonale (utilizzo di 3 principi attivi). Questo protocollo, che avviene con modalità differenti in relazione al sesso degli animali, ha permesso ai ricercatori di portare a piena maturazione i maschi in un tempo di circa 10-12 settimane mentre per le femmine il tempo impiegato è risultato più lungo (15-20 settimane).

Nel 2012, grazie alla collaborazione con una azienda leader nel settore, è stata progettata una particolare "sala parto-incubatoio" attraverso la quale si è ottenuta la riproduzione spontanea dell'anguilla: al termine del programma ormonale i riproduttori (1 femmina e 4 maschi) vengono introdotti in questa particolare vasca e nell'arco di 12 ore si ottiene, in circa il 70% dei casi, l'accoppiamento degli animali evitando in tal modo la pratica della spremitura. Con questa metodica si è ridotto lo stress dei riproduttori e praticamente si sono azzerati gli shock meccanici da manipolazione portando ad un miglioramento della fecondità relativa delle anguille, ad un aumento della percentuale di fecondazione delle uova ed ad un miglioramento della qualità delle larve ottenute.

Da due anni si stanno svolgendo test di laboratorio per valutare la possibilità di un ulteriore passo avanti nella sperimentazione: lo svezzamento larvale.

Bibliografia

Di Biase A., Casalini A., Emmanuele P., Mandelli M., Lokman P.M. & Mordenti O. (2015). Controlled reproduction in *Anguilla anguilla* (L.): Comparison between spontaneous spawning and stripping-insemination approaches. (2015) Aquaculture Research, 1-9.

Mordenti O., Casalini A., Mandelli M. & Di Biase A.(2014). A closed recirculating aquaculture system for artificial seed production of the European eel (*Anguilla anguilla*): Technology development for spontaneous spawning and eggs incubation. Aquacultural Engineering, 58, pp. 88-94.

Mordenti O., Biase A.D., Bastone G., Sirri R., Zaccaroni A. & Parmeggiani, A.(2013). Controlled reproduction in the wild European eel (*Anguilla anguilla*): Two populations compared Aquaculture International, 21 (5), pp. 1045-1063.

STATO DELL'ARTE E NUOVE FRONTIERE NELLA NUTRIZIONE DELLE SPECIE ITTICHE DULCIACQUICOLE

Bonaldo A.

Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Alma Mater Studiorum Università di Bologna, Cesenatico (FC);

Nel contesto nazionale dell'acquacoltura con particolare riferimento alle specie d'acqua dolce, il mangime utilizzato in allevamento, la sua formulazione, composizione e i costi sostenuti rappresentano fattori chiave che possono determinare o meno il successo di un'azienda. Se da una parte l'alimento è chiamato a garantire buone produzioni, buoni indici di conversione, sostenibilità economica, qualità e sicurezza del prodotto, dall'altra è aumentata notevolmente la complessità che caratterizza tutta la filiera produttiva del mangime. E' notevolmente aumentato il numero di ingredienti utilizzati per le formulazioni ed è estremamente migliorata la tecnologia produttiva e gli standard di controllo della qualità. In questo contesto, l'utilizzo di farina e olio di pesce continuano comunque a rappresentare da una parte una gamma di ingredienti di alta qualità, ormai di uso esclusivo dell'acquacoltura, dall'altra sono sempre più motivo di preoccupazione come "collo di imbuto" per un'adeguata sostenibilità del mangime che ha quindi visto negli ultimi dieci anni profondi cambiamenti di composizione. Per una crescita del settore dulciacquicolo, spesso in concorrenza con competitori esteri con prezzi di produzione inferiori, è quindi necessario disporre di diete che contengano quantità sempre più alte di ingredienti sostenibili ed economicamente vantaggiosi. Tuttavia, gli effetti che questa graduale sostituzione esercitano su performance di crescita, benessere dell'animale e qualità del prodotto sono attualmente oggetto di studio ma anche di forte dibattito all'interno del settore. E' necessario uno sforzo comune di allevatori e mangimisti per continuare a garantire lo sviluppo di nuovi mangimi sempre più sostenibili ed efficaci. Recentemente sono oggetto di studio nuovi ingredienti come farine di insetti, farine di alghe o di lieviti la cui efficacia non è ancora stata ben chiarita e di cui ad oggi, alla luce dei costi di produzione e delle potenzialità produttive di queste materie prime, viene messa in dubbio la fattibilità di utilizzo a livello industriale. Sta inoltre crescendo l'interesse per una serie di prodotti ad uso additivo, come oli essenziali, prebiotici, probiotici che sarebbero in grado di migliorare e ottimizzare le caratteristiche nutrizionali delle diete andando ad intervenire su specifici aspetti fisiologici come la salute intestinale, le caratteristiche del microbiota e il trofismo della mucosa destinata all'assorbimento dei nutrienti. Da ultimo, va considerata l'importanza di effettuare studi mirati sulla nutrizione e alimentazione di alcune specie "minori" come lo storione per lo sviluppo di diete specifiche.

INDICE

PRIMI AUTORI

(PRESENTAZIONI ORALI)

		PAGINA
Bedendo G.	<i>Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro (PD)</i>	13
Bona M.C.	<i>BEAR BioStatistica, Epidemiologia e Analisi del Rischio</i>	26
Borella L.	<i>Università degli Studi di Milano, Dipartimento di Scienze Veterinarie per la Salute, la Produzione Animale e la Sicurezza Alimentare (MI)</i>	20
Burioli E.A.V.	<i>Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino</i>	17 21
Capparucci F.	<i>Dipartimento di Scienze Chimiche, Biologiche, Farmaceutiche ed Ambientali, Università di Messina</i>	29
Caruso C.	<i>Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino</i>	18
Ceolin C.	<i>Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie</i>	31
Cipriano A.	<i>Dipartimento di Scienze Chimiche, Biologiche, Farmaceutiche ed Ambientali, Università degli Studi di Messina</i>	25
Culurgioni J.	<i>Agris Sardegna - Agenzia per la Ricerca in Agricoltura. Servizio Ricerca per i Prodotti Ittici</i>	24
De Benedetto G.	<i>Dip. di Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Messina</i>	28
Gatti F.	<i>Azienda Provinciale per i Servizi Sanitari di Trento</i>	32
Gustinelli A.	<i>Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Università di Bologna, Ozzano Emilia (BO)</i>	23
Manfrin A.	<i>Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, CSI Adria (RO)</i>	33
Massimo M.	<i>Dipartimento di Scienze Agroalimentari, Ambientali e Animali, Università degli Studi di Udine, Udine (UD)</i>	22
Pascoli F.	<i>Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro (PD)</i>	15
Pastorino P.	<i>Laboratorio Specialistico di Ittiopatologia – Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta – Torino</i>	30
Prearo M.	<i>Laboratorio Specialistico di Ittiopatologia – Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta – Torino</i>	27 34

Salvador	<i>Associazione Piscicoltori Italiani (API)</i>	35
Saroglia M.	<i>Dpt. Biotecnologie e Scienze della Vita, Università degli Studi dell'Insubria, Varese</i>	36
Tibaldi E.	<i>Università degli Studi di Udine, Dipartimento di Scienze Agroalimentari, Ambientali e Animali (DI4A)</i>	37
Toffan A.	<i>Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro (PD)</i>	14
Volpe E.	<i>Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Università di Bologna, Viale Vespucci, 2, 47042 Cesenatico, FC, Italia</i>	16 19