



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
Dipartimento di Biomedica Comparata e Alimentazione

Corso di laurea magistrale a ciclo unico in
MEDICINA VETERINARIA

**Malattia nodulare branchiale, patologia
emergente negli allevamenti italiani di
trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*)**

Relatore
Prof. Francesco Quaglio
Correlatore
Dott. Paolo Bronzatti

Laureando
Alberto Perolo
Matricola n.
612808/MV

ANNO ACCADEMICO 2014/2015

INDICE

RIASSUNTO	1
ABSTRACT	3
1 INTRODUZIONE	5
1.1 PANORAMICA SULLA TROTICOLTURA ITALIANA	5
1.1.1 Specie di salmonidi allevate in italia	5
1.1.2 Storia della trotticoltura italiana	8
1.1.3 Situazione attuale	9
1.1.4 Trotticoltura nel trentino	10
1.1.5 Situazione europea	11
1.2 PATOLOGIE EMERGENTI IN TROTICOLTURA	12
1.2.1 Malattia del sonno	12
1.2.2 Red mark disease	12
1.2.3 Gastroenterite della trota iridea	13
1.3 PATOLOGIE SOGGETTE A PIANI DI RISANAMENTO IN TRENTINO	14
1.3.1 Setticiemia emorragica virale	14
1.3.2 Necrosi ematopoietica infettiva	15
1.4 LE BRANCHE	16
1.4.1 Anatomia branchiale	16
1.4.2 Fisiologia branchiale	17
1.4.3 Patologia branchiale	18
1.4.3.1 Forma proliferativa	19
1.4.3.1.1 Proliferazione delle cellule epiteliali pavimentose	19
1.4.3.1.2 Proliferazione delle cellule mucipare	21
1.4.3.1.3 Proliferazione delle cellule del cloruro	22
1.4.3.1.4 Proliferazione delle cellule x	22
1.4.3.2. Forma necrotica	23
1.4.3.3 Stiramento dell'epitelio lamellare	23
1.4.3.4. Alterazioni circolatorie	23
1.4.3.4.1 Aneurisma	23
1.4.3.4.2 Iperemia e congestione	23
1.4.3.4.3 Emorragia	24

1.4.3.4.4 Anemia	24
1.4.3.4.5 Trombi ed emboli	24
1.5 PRINCIPALI PATOLOGIE BRANCHIALI	25
1.5.1 Flavobatteriosi	25
1.5.2 Costiasi	26
1.5.3 Ictioftiriasi	27
1.5.4 Malattia da gas	27
1.5.5 Malattia branchiale polifattoriale	28
2 PARTE SPERIMENTALE	31
2.1 OBIETTIVODELLA RICERCA	31
2.2 MATERIALI E METODI	33
2.2.1 Prima fase di monitoraggio	33
2.2.1.1 Esame clinico in allevamento	35
2.2.1.2 Analisi dei parametri fisico-chimici dell'acqua	35
2.2.1.3 Campionamento di trote per vasca	36
2.2.1.4 Esame microscopico a fresco	37
2.2.1.5 Esame necroscopico	37
2.2.1.6 Esame batteriologico	37
2.2.1.7 Esame istologico	38
2.2.1.8 Esame parassitologico	39
2.2.2 Seconda fase di monitoraggio	39
2.3 RISULTATI	41
2.3.1 Risultati della prima fase di monitoraggio	41
2.3.1.1 Esito dell'esame anamnestico	41
2.3.1.3 Risultati delle analisi delle acque	43
2.3.1.3.1 Ossigeno	43
2.3.1.3.2 Temperatura	44
2.3.1.3.3 pH	44
2.3.1.3.4 Ammoniaca	45
2.3.1.3.5 Nitriti	45
2.3.1.4 Esiti dell'esame necroscopico	46
2.3.1.5 Esiti dell'esame microscopico a fresco	48
2.3.1.6 Esiti esame batteriologico	51
2.3.1.7 Esiti esame istologico Ematossilina-Eosina	52
2.3.1.8 Esito dell'esame parassitologico	56

2.3.1.9 Esiti esame istologico con colorazione di Giemsa	57
2.3.1.9.1 Gradazione delle lesioni iperplastiche	60
2.3.1.9.2 Gradazione delle infestazioni da ameba	65
2.3.1.10 Esiti delle altre colorazioni istologiche.....	68
2.3.2 Risultati della seconda fase di monitoraggio.....	69
2.3 DISCUSSIONE	73
2.4 CONCLUSIONI.....	81
BIBLIOGRAFIA	83

RIASSUNTO

A partire dal 2012 è stato riscontrato un aumento della mortalità negli allevamenti trentini di trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*). I pesci colpiti manifestavano i sintomi tipici da malattia branchiale (opercoli divaricati, ipermucosità ed anemia) con mortalità fino al 60% durante i mesi invernali. Allo scopo di studiarne l'eziologia sono state eseguite analisi delle acque nelle vasche di alcune trotiltiture in Provincia di Trento seguite da esami necroscopici, batteriologici, istologici e parassitologici di tessuto branchiale da pesci che presentavano sintomatologia clinicamente evidente.

Dalla valutazione dei parametri delle acque, effettuata tra febbraio e aprile 2014, non è emersa alcuna alterazione chimico-fisica significativa correlabile alla patologia. Gli esami batteriologici delle branchie erano finalizzati alla ricerca di mixobatteri. Non sono stati riscontrati legami evidenti tra microrganismi del genere e malattia branchiale.

All'istologia le branchie mostravano intensa reazione proliferativa epiteliale con fusione delle lamelle secondarie e, nei casi più gravi, dei filamenti. Il quadro sintomatologico era simile a quanto descritto nella "Amoebic gill disease" di salmoni allevati in Australia (Tasmania), America settentrionale (Canada e Stati Uniti), Europa (Irlanda, Francia, Spagna, Scozia e Norvegia), America meridionale (Cile) ed Africa (Sudafrica) e nella "Nodular Gill Disease" di trote allevate in Europa settentrionale (Danimarca, Germania, Polonia e Repubblica Ceca) e Nord America (Canada e Stati Uniti).

All'esame istologico con colorazione di Giemsa sono stati individuati microrganismi unicellulari appartenenti all'ordine delle amebe. L'esame parassitologico con semina di tessuto branchiale a fresco ha permesso di rilevare numerose amebe in replicazione. Studi per la tipizzazione del parassita sono tutt'ora in corso.

La ricerca è proseguita fino ad aprile 2015, quantificando le lesioni istologiche e il grado di infestazione del parassita. Da quanto esaminato fino ad ora risulta evidente una correlazione tra le lesioni proliferative e il numero di amebe presenti nel tessuto branchiale.

ABSTRACT

Since 2012 there has been found an increased mortality in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) farming of the Trento province. The affected fish showed typical symptoms of the gill disease (flared operculae, increased mucus and anemia) reaching mortality rates approaching 60% during the winter months.

Water analysis were carried out from the tanks of some Trentino trout farms to investigate the etiology of this disease. The results of physicochemical parameters obtained between February and April 2014 didn't show correlations with the pathology. The bacteriological examinations from the gills were carried out to find mixobacterial infections. No correlations were found between the bacterium presence and gill disease.

Histology exam show an intense proliferative reaction of gill tissue with fusion of secondary lamellae and, in the most severe cases, of filaments. These lesion were similar to those described in "Amoebic Gill Disease" in marine salmon farming in Australia (Tasmania), North America (Canada and USA), Northern Europe (Ireland, France, Spain, Scotland and Norway), Southern America (Chile) and Africa (South Africa) and in "Nodular Gill Disease" in freshwater trout farming in Nord Europe (Denmark, Germany, Poland and Czech Republic) and Northern America (Canada and USA).

Unicellular microorganism belonging to the amoeba order have been identified by microscopic examinations with histological Giemsa staining. Parasitological analysis conducted by cultured of fresh gill tissue permitted to reveal presence of replicating amoebae. Biomolecular studies to typing amoebic organism are required.

The research continued until April 2015, quantifying the histological lesions and the degree of infestation of the parasite. Up to now, the researches show an evident correlation between the proliferative lesions and the number of amoebae present in the gill tissue.

1 INTRODUZIONE

1.1 PANORAMICA SULLA TROTICOLTURA ITALIANA

1.1.1 SPECIE DI SALMONIDI ALLEVATE IN ITALIA

- **Trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*):** Salmonide alloctono proveniente da una vasta area dell'America settentrionale, idrograficamente tributaria del Pacifico. Introdotta nel continente europeo nel 1882 (Manzoni, 2008) è divenuta la specie ittica più allevata in Italia grazie alla sua adattabilità e al rapido accrescimento. Le trote iridee si riconoscono per una colorazione che va dal blu-metallico-verde dorsalmente al bianco ventralmente (figura 1). E' inoltre presente una fascia rosata estesa lateralmente dall'opercolo branchiale fino al peduncolo caudale. Sui fianchi, in particolare nella zona dorsale, sono presenti punti neri estesi anche sulla pinna dorsale, caudale e adiposa. La trota iridea può raggiungere lunghezze superiori al metro nel suo areale di origine mentre, nei corsi d'acqua italiani, le taglie sono inferiori. In America settentrionale sono presenti sia popolazioni che svolgono tutto il ciclo vitale in acqua dolce sia forme anadrome che, dopo aver vissuto in mare per alcuni anni, risalgono i fiumi per riprodursi.



Figura 1: Trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*). Fonte: www.thara-see-lounge.com

- **Trota fario (*Salmo trutta*):** Trota autoctona italiana allevata principalmente per ripopolamento e pesca sportiva. Presenta una colorazione grigio-verde dorsalmente e bruna lateralmente con numerose macchie nere o rosse, talvolta cerchiata da un alone biancastro, su testa e fianchi (figura 2). La trota fario comune raggiunge lunghezze di oltre 50 cm mentre la sottospecie marina (*Salmo trutta trutta*) può superare il metro e mezzo di lunghezza.



Figura 2: Trota fario (*Salmo trutta*). Fonte www.pesca.provincia.treviso.it

- **Trota marmorata (*Salmo trutta marmoratus*):** Considerata una sottospecie della trota fario, con la quale si ibrida frequentemente, è autoctona nei corsi d'acqua alpini italiani che sfociano nell'Adriatico. Viene allevata essenzialmente per progetti di ripopolamento di corsi d'acqua. Possiede una livrea grigio-verde dorsalmente che si schiarisce lateralmente con tonalità giallo-argentee. Tipiche di questa specie sono le marmoreggiature scure o grigio chiaro presenti su testa, dorso e fianchi (figura 3). Gli esemplari adulti possono arrivare a 140 cm di lunghezza.



Figura 3: Trota marmorata (*Salmo trutta marmoratus*). Fonte: www.pesca.provincia.treviso.it

- **Salmerino alpino (*Salvelinus alpinus*):** Specie autoctona italiana appartenente alla famiglia dei salmonidi e presente nei laghi del Trentino e Alto-Adige. E' allevata attivamente sia per ripopolamento che a fini alimentari per la sua adattabilità, il rapido accrescimento e l'alto valore di mercato. La colorazione (molto variabile) è blu-metallico, verdastra o grigio-argentea dorsalmente per poi schiarirsi lungo i fianchi fino a raggiungere una tonalità bianco giallastra sul ventre (figura 4). Dorso e fianchi presentano macchie rosa, bianche o gialle mentre le pinne pettorali, ventrali e anali possiedono una colorazione arancione con margine anteriore bianco. Raggiunge i 40 cm di lunghezza.



Figura 4: Salmerino alpino (*Salvelinus alpinus*). Fonte: www.igiardinidellacqua.com

- **Salmerino di fonte (*Salvelinus fontinalis*):** Specie nordamericana introdotta in alcuni laghi e fiumi dell'Italia settentrionale per la pesca sportiva. Presenta una colorazione bruno-verde sul dorso con caratteristiche vermicolature gialle o verde oliva (figura 5). Il ventre assume una pigmentazione gialla o rosa mentre le pinne pettorali ventrali e anali presentano un primo raggio bianco seguito da una linea nerastra. Raggiunge i 40 cm di lunghezza.



Figura 5: Salmerino di fonte (*Salvelinus fontinalis*). Fonte: www.naturfoto-cz.de

1.1.2 STORIA DELLA TROTCOLTURA ITALIANA

Il primo allevamento di trote in Italia sorse sulle rive del lago di Avigliana (Torino) nel 1860, mentre le prime stazioni di riproduzione e ripopolamento dei fiumi fecero la loro comparsa nel Lazio e nel Trentino solo negli anni trenta.

Dal dopoguerra comparvero le prime trottocolture a conduzione familiare caratterizzate da produzioni inizialmente modeste che, negli anni sessanta, raggiunsero le 7.000-8.000 tonnellate. Le trote raramente superavano la taglia media di 250 grammi e venivano commercializzate localmente da ambulanti o impiegate nelle prime pesche sportive.

Molti degli allevamenti tuttora in attività nacquero tra il 1970 e il 1980, si trattava di strutture moderne di grosse dimensioni, sebbene caratterizzate da basse densità produttive ed elevati ricambi d'acqua. Nei nuovi impianti la produzione crebbe ulteriormente, raggiungendo le 20.000 tonnellate annuali, la taglia media venne portata a circa 300 grammi e comparvero le prime trote salmonate. In questo periodo, grazie la grande distribuzione, le trote oltre che localmente iniziarono ad essere vendute nelle pescherie delle grandi città.

Tra la fine degli anni ottanta e i primi anni novanta iniziò a svilupparsi un forte interesse da parte del consumatore verso i filetti di pesce in generale e quindi anche per quelli di trota. Per far fronte a tale richiesta aumentarono gli esemplari allevati fino a taglie medio-grandi (600-1.000g) indirizzate alla salmonatura e, grazie a questo nuovo sbocco sul mercato, la produzione raggiunse il picco delle 51.000 tonnellate annuali nel 1997 (figura 6).

In questo periodo l'impiantistica degli allevamenti non subì grandi modifiche né vennero costruiti nuovi impianti di entità significativa, ma furono applicate nuove tecnologie che permisero di mantenere i costi di produzione compatibili con la vendita. In particolare l'utilizzo di mangimi estrusi (ottenuti tramite estrusione ad alta temperatura e pressione) permise di ottenere un prodotto di maggior consistenza (D'Agaro, 2007) ed altamente energetico che migliorava la conversione alimentare, l'accrescimento medio giornaliero e la ritenzione azotata (Lanari et al., 1995). L'impiego di ossigeno liquido portò ad un ulteriore aumento della densità di trote allevate per vasca e permise un miglior controllo del livello di O₂ in vasca.

Verso la fine degli anni novanta si è verificata una progressiva saturazione del mercato con seguente riduzione del prezzo di vendita. Il settore della trottocoltura ha quindi subito una forte contrazione (Sarti, 2000).

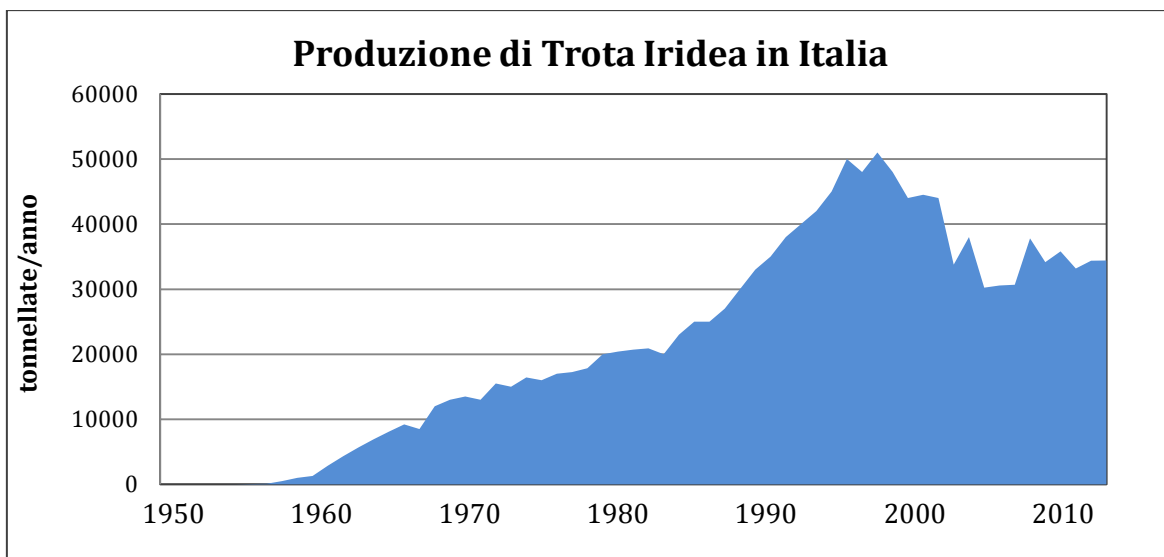


Figura 6: Produzione italiana di trota iridea dal 1950 al 2012. Fonte: FAO, Fishstat, 2013.

1.1.3 SITUAZIONE ATTUALE

Negli ultimi anni la produzione italiana di trote a carne bianca e salmonata si è stabilizzata attorno alle 35.000 tonnellate annuali. Nonostante la contrazione avvenuta tra la fine degli anni novanta e inizio duemila, la trota iridea rimane ampiamente la specie ittica più allevata nel territorio italiano (figura 7) rappresentando oltre il 65% dell'allevamento di pesce in Italia (API, 2014).

Considerando nel complesso il settore dell'acquacoltura nazionale, comprendente molluschi pesci crostacei e alghe, la troticoltura viene ampiamente superata in termini quantitativi dalla molluscoltura (figura 8).

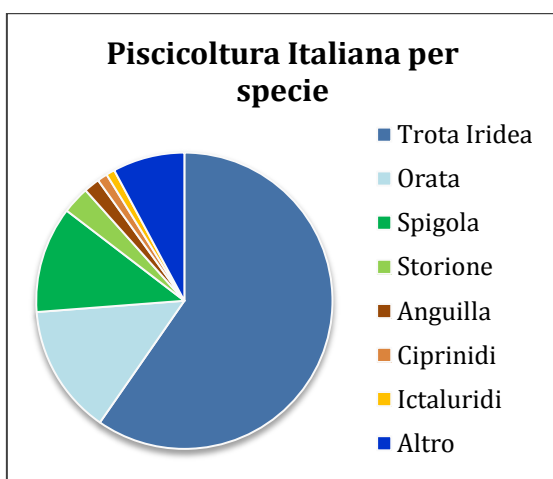


Figura 7: Piscicoltura italiana per specie. Fonte: API, 2014.

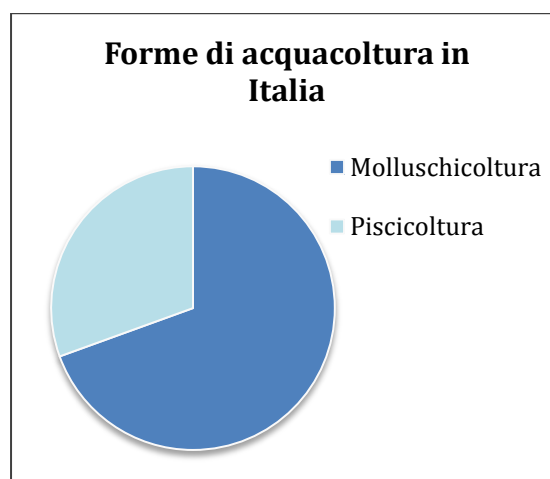


Figura 8: Forme di acquacoltura in Italia. Fonte: Castiglione 2009.

La troticoltura italiana è concentrata prevalentemente al nord dove sono localizzati circa il 75% degli allevamenti, in particolare le regioni Friuli Venezia-Giulia e Veneto producono

da sole la metà delle trote italiane (figura 9 e 10). A seguire troviamo il centro Italia dove sono situati circa il 18% degli impianti (in particolar modo in Umbria e Abruzzo) ed infine il sud e le isole con circa il 7% (Iandoli & Trincanato, 2007). Tale distribuzione non è casuale, le trote infatti necessitano di acque fredde e ben ossigenate tipiche delle regioni settentrionali e centrali.

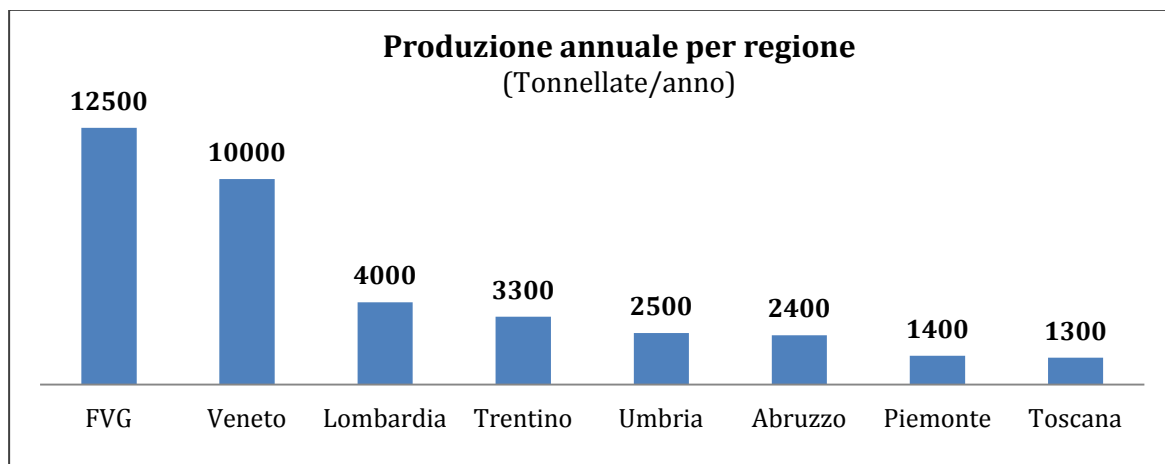


Figura 9: Principali regioni italiane per produzione di trota iridea. Fonte: Fabris, 2012.

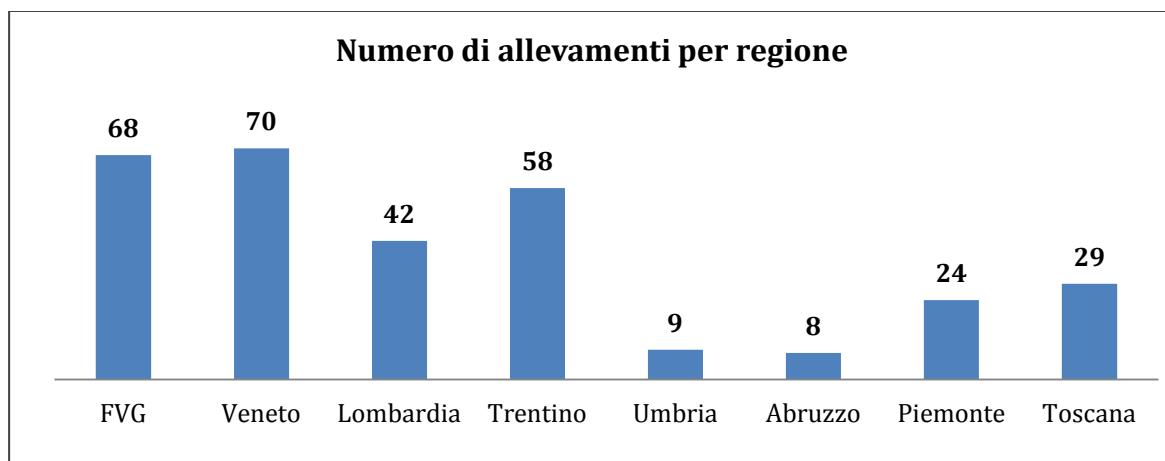


Figura 10: Principali regioni italiane per numero di trotilcolture. Fonte: Fabris, 2012.

1.1.4 TROTICOLTURA NEL TRENINO

Il Trentino rappresenta storicamente la culla della trotilcoltura italiana, qui sono sorti molti dei primi allevamenti già verso la fine del 1800. Al giorno d'oggi la provincia, invece che puntare su grandi produzioni intensive, si è orientata verso un prodotto di elevata qualità riconosciuto sul mercato come tale. Morfologicamente il Trentino possiede un territorio ideale per l'allevamento della trota iridea, i corsi d'acqua sono ben ossigenati e mantengono basse temperature che, sebbene allunghino il ciclo di produzione, permettono di ottenere un prodotto con carni magre e di ottima qualità.

Le trocolture del Trentino si distinguono anche per una forte diversificazione del prodotto, sia per quanto riguarda la tipologia (uova embrionale, novellame da ripopolamento e da rimonta, trote a diversa pezzatura), sia per le specie allevate (oltre alla diffusa trota iridea si allevano anche trota fario e salmerini). Nel settore del ripopolamento ittico il Trentino rimane leader in Italia nonostante la forte concorrenza di alcuni paesi stranieri (Borroni, 2007).

Va infine ricordato che nella provincia di Trento è in atto un piano di risanamento per la setticemia emorragica virale (SEV) e la necrosi ematopoietica infettiva (NEI) due patologie virali sostenute dal genere *Novirhabdovirus* che, sebbene innocue per l'uomo, possono provocare un calo della qualità del prodotto.

1.1.5 SITUAZIONE EUROPEA

Ancora oggi l'Italia mantiene il suo ruolo leader nell'allevamento della trota iridea all'interno dell'Unione Europea. Il nostro paese è specializzato nella produzione di trote leggere a carne bianca mentre la maggior parte delle trote pesanti salmonate sono prodotte nei paesi centro e nord europei (figura 11) come Danimarca, Finlandia, Svezia, e Francia (FEAP, 2014).

Analizzando solo l'Unione Europea non vengono prese in considerazione la Norvegia e la Turchia, due paesi che vantano ingenti produzioni di trota. Il primo grazie ad una favorevole conformazione del territorio si è specializzato in trote salmonate raggiungendo le 70.000 tonnellate annuali. Il secondo ha conosciuto nell'ultimo decennio un forte sviluppo dell'allevamento di trote a carne bianca arrivando a superare le 111.000 tonnellate annuali nel 2013 (FEAP, 2014).

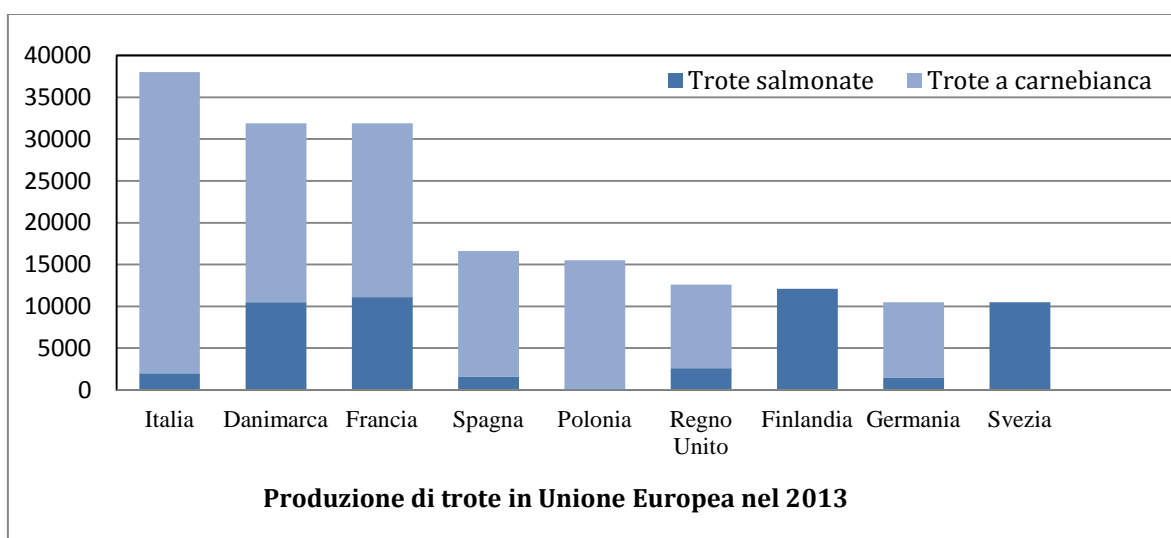


Figura 11: Principali stati dell'UE per produzione di trote a carne bianca e salmonate. Fonte: FEAP, 20

1.2 PATOLOGIE EMERGENTI IN TROTTICOLTURA

Negli ultimi anni sono comparse nuove malattie che interessano la trota iridea, altre invece seppur segnalate già da tempo negli allevamenti italiani, hanno acquisito una maggior patogenicità portando ad aumenti della mortalità e ritardi nella crescita delle trote.

1.2.1 MALATTIA DEL SONNO

Patologia a carico del tessuto muscolare e pancreatico che riduce la funzionalità natatoria della trota costringendola a giacere a fondo vasca su un fianco. Si ritiene causata da un RNA virus appartenente alla famiglia delle togaviridae. Alcuni studi hanno inoltre dimostrato una forte correlazione morfologica e genomica fra tale virus e quello che causa la malattia del pancreas nel salmone atlantico (Weston et al., 1999).

La malattia del sonno ha come ospite d'elezione la trota iridea (in particolar modo trotelle di 50 o 100 grammi) e si manifesta principalmente nei mesi primaverili quando le temperature delle acque si aggirano tra i 10 e 13 °C.

La trasmissione avviene attraverso il contatto del pesce con feci e liquidi biologici contenenti l'agente virale (Bovo, 2007).

I soggetti infetti rimangono sul fondo distesi su un fianco a causa delle lesioni necrotiche della muscolatura, l'animale mantiene comunque uno stato vigile e sfugge ai tentativi di cattura. Il virus provoca lesioni necrotiche a livello del pancreas esocrino impedendo una normale assimilazione alimentare. Si viene quindi a creare una situazione di malassorbimento, seguita da un mancato accrescimento corporeo e un conseguente allungamento del ciclo produttivo per raggiungere la taglia di mercato. Normalmente gli episodi clinici durano per un periodo che va dai 30 ai 60 giorni (Bovo, 2007).

Segnalata in Francia già agli inizi negli anni ottanta (Boucher & Baudin, 1994) la malattia del sonno si è poi diffusa in Spagna, Belgio, Italia e Gran Bretagna (Branson, 2002) acquisendo negli ultimi anni una maggior patogenicità. In Italia si stima sia presente nel 40% degli allevamenti e, sebbene la mortalità sia molto bassa, causa significative perdite economiche per mancato accrescimento ponderale.

1.2.2 RED MARK DISEASE

Patologia cutaneo-muscolare che colpisce trota iridea ed altri salmonidi a temperature inferiori ai 15 °C. Nonostante i diversi studi al riguardo non si è ancora riusciti a determinare l'agente eziologico della Red Mark Disease, sebbene recenti ricerche abbiano comunque evidenziato una correlazione della patologia con *Flavobacterium psychrophilum*

(Ferguson et al., 2006). Segnalata per la prima volta in Scozia nel 2003 (Verner-Jeffreys et al., 2006), in breve tempo si è diffusa in tutta la Gran Bretagna per poi passare nel continente europeo.

La Red Mark Disease si manifesta con lesioni cutanee lungo il fianco, inizialmente appaiono come piccole macchie dall'aspetto mucoso per poi evolversi in lesioni gonfie ed arrossate al centro (figura 12). Le ferite sono la conseguenza di una forte infiammazione del derma e muscolare con infiltrazione di linfociti e macrofagi che danno il tipico aspetto rilevato alla lesione.

La maggior parte dei soggetti positivi alla Red Mark risultano comunque asintomatici. La malattia, caratterizzata da un alta morbilità e bassa mortalità, provoca essenzialmente danni economici per deprezzamento delle carni colpite.



Figura 12: Redmark disease, lesione cutanea, Fonte: Roberto Giavenni.

1.2.3 GASTROENTERITE DELLA TROTA IRIDEA

Malattia causata da *Candidatus arthromitus*, battere che rilascia endospore nel lume intestinale provocando una grave gastroenterite nella trota iridea ed altri salmonidi. Segnalata nei primi anni novanta in Francia e Spagna la RTGE si è poi diffusa in altri paesi europei.

I sintomi compaiono durante i mesi estivi quando la temperatura dell'acqua supera i 15°C, l'animale colpito manifesta letargia ed inappetenza, le feci assumono un aspetto mucoso e occasionalmente si notano discromie cutanee e atassia natatoria.

All'esame necroscopico si osserva un'inflammatione della mucosa intestinale con edemi, emorragie e iperproduzione di muco.

La mortalità si aggira in media attorno allo 0,5-1% ma può arrivare anche al 4% in concomitanza con fattori stressanti o cambi repentini di dieta. Le perdite economiche per mancato accrescimento ponderale sono sensibili (Michel et al., 2002).



Figura 13: Gastroenterite della trota iridea, congestione intestinale con edema. Fonte: *Histopathology and Ultrastructure of Segmented Filamentous Bacteria–Associated Rainbow Trout Gastroenteritis*.

1.3 PATOLOGIE SOGGETTE A PIANI DI RISANAMENTO IN TRENTINO

Nella provincia di Trento sono in atto da anni piani di risanamento volti a limitare la diffusione della Setticemia Emorragica Virale e della Necrosi Ematopoietica Infettiva.

La strategia di controllo, tutt'ora in corso, prevede verifiche diagnostiche per l'acquisizione o il mantenimento dello stato indenne dell'allevamento, movimentazione delle trote accompagnate da certificazione sanitaria, esame di vettori, serbatoi e fattori di rischio e disinfezioni dei mezzi di trasporto (Costanzi, 2007).

1.3.1 SETTICEMIA EMORRAGICA VIRALE

Patologia virale sostenuta dal genere *Novirhabdovirus* denominato anche virus di Egtved (Jensen, 1963) e diffusa in gran parte dell'Europa. La trota iridea rappresenta l'ospite d'elezione con mortalità che può raggiungere il 100% nei soggetti giovani di 3 o 5 grammi mentre si riduce nelle taglie maggiori.

La malattia si manifesta entro un intervallo di temperatura compreso tra 8 e 12 °C. Ghittino (1985) descrive tre fasi della Setticemia Emorragica Virale: acuta, cronica e nervosa.

Nella forma acuta le trote, oltre all'elevata mortalità, manifestano iperpigmentazione cutanea, letargia, esoftalmo monolaterale, emorragie cutanee, perioculari e alla base delle

pinne. Le branchie possono essere anemiche con presenza di petecchie o soffusioni emorragiche. All'esame necroscopico si osservano emorragie diffuse a livello di muscolo striato, grasso periviscerale, vescica natatoria, fegato, cuore e peritoneo.

La forma cronica segue quella acuta ed è caratterizzata da una mortalità ridotta e prolungata. La sintomatologia è simile alla fase acuta ma aumenta l'intensità di anemia e iperpigmentazione cutanea mentre si riducono i fenomeni emorragici.

La forma nervosa è diagnosticata osservando le trote direttamente in vasca dove manifestano atassia natatoria con movimenti natatori a spirale.

La via di trasmissione è solamente orizzontale tramite acque contaminate, la superficie delle uova può comunque veicolare il virus fungendo da vettore.

1.3.2 NECROSI EMATOPOIETICA INFETTIVA

Grave malattia virale causata dal genere *Novirhabdovirus*, originaria dell' America settentrionale e segnalata a partire dalla fine degli anni ottanta anche in alcuni paesi europei tra cui l'Italia (Bovo et al., 1987).

La virosi colpisce varie specie di salmonidi tra cui la trota iridea dove compare principalmente a basse temperature negli stadi giovanili, manifestandosi con elevate mortalità.

I sintomi più frequenti sono iperpigmentazione cutanea, esoftalmo, ascite, feci mucose, emorragie alla base delle pinne, scoliosi, lordosi ed anemia branchiale.

All'esame necroscopico si osservano emorragie petecchiali a livello muscolare, nel grasso periviscerale e alla base delle pinne pettorali. Istologicamente è possibile osservare una grave necrosi del tessuto ematopoietico renale e splenico.

La via di trasmissione è orizzontale attraverso feci, urine e altri fluidi corporei. Non è stata confermata una via trasmissione verticale, si ritiene piuttosto che il virus rimanga intimamente adeso alla superficie delle uova (Amend, 1975).

1.4 LE BRANCHE

1.4.1 ANATOMIA BRANCHIALE

La respirazione nei pesci avviene attraverso le branchie, organi pari posti ai lati del capo e coperti da un opercolo osseo che le protegge dall'esterno. La cavità anatomica in cui sono presenti le due branchie è definita camera branchiale, riceve il flusso d'acqua proveniente dalla cavità buccale e lo riversa all'esterno dell'organismo. In ogni camera vi sono quattro olobranchie sostenute ciascuna da un arco branchiale, struttura ossea curva da cui si propagano cranialmente delle branchiospine adibite alla filtrazione del cibo. Caudalmente gli archi sostengono due file divergenti di filamenti branchiali dette anche emibranchie che costituiscono il vero e proprio organo respiratorio. Da questi filamenti si dipartono una serie di ripiegamenti semilunari trasversali, dette lamelle, che danno alla struttura filamentosa un aspetto arboriforme tipico (figura 14).

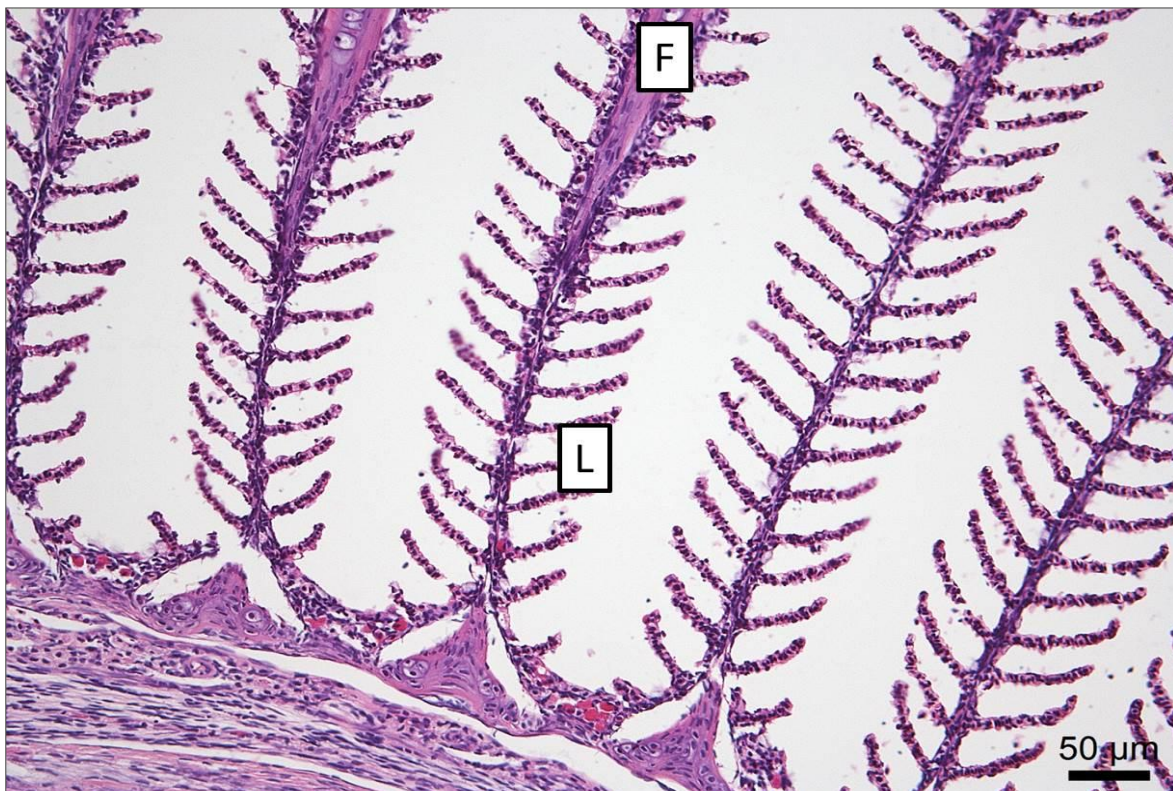


Figura 14: Filamenti (F) e lamelle (L) branchiali. Fonte: Declercq et al. *VeterinaryResearch* (2015), (E-E)

Ogni olobranchia è irrorata da un'arteria branchiale afferente, proveniente dall'aorta ventrale, che, passando attraverso l'arco branchiale, si dirama in varie arterie afferenti del filamento. A loro volta questi vasi vanno a formare, a livello delle lamelle, delle arteriole lamellari afferenti che si diramano in capillari coinvolti negli scambi gassosi per poi

raccogliersi nelle arteriole lamellari efferenti. Questi vasi confluiscono nelle arterie efferenti del filamento per poi entrare nell'arteria branchiale efferente all'interno dell'arco branchiale. Il sangue ossigenato sfocia quindi nell'aorta dorsale da cui irrorata tutto l'organismo.

Gli archi branchiali sono sostenuti da una struttura cartilaginea che ossifica con il progredire dell'età del pesce. Questa impalcatura è circondata da tessuto connettivo denso dentro cui scorrono i vasi sanguigni ed i muscoli adduttori che modificano l'angolo di apertura dei filamenti regolando la ventilazione. Esternamente un rivestimento epidermico ricco di cellule mucipare ricopre l'arco branchiale ispessendosi all'origine dei filamenti. Questo strato è in continuità con la mucosa della cavità orale e con l'epitelio respiratorio delle lamelle creando un'unica barriera epiteliale contro l'ambiente esterno. I filamenti branchiale, costituiti da un asse centrale cartilagineo, possiedono una stratificazione simile agli archi branchiali da cui si diramano, inoltre si osservano cellule immunitarie come melanociti, linfociti e cellule granulari eosinofile/mastociti.

Le lamelle sono avvolte da uno strato di epitelio pavimentoso semplice poggiante su una lamina basale. Il rivestimento esterno è mantenuto distaccato dalle cellule a pilastro (cellule di Bietrix) che compongono l'impalcatura strutturale della lamella. Il citoplasma di queste cellule è provvisto di fibrille contrattili che regolano la distanza tra le due superfici epiteliali della lamella e il volume dei capillari. Marginalmente le cellule a pilastro si espandono parallele alla lamina basale e, congiungendosi le une alle altre, creano delle lacune lamellari entro cui scorrono gli eritrociti. Alla base delle lamelle sono presenti le cellule del cloruro (acidofile) che svolgono un ruolo fondamentale nell'osmoregolazione riassorbendo cloruri attraverso un trasporto attivo di membrana e sono coinvolte nei meccanismi della regolazione idro-salina. Queste cellule si riconoscono per il citoplasma granuloso eosinofilo dovuto alla presenza di un elevato numero di mitocondri.

1.4.2 FISIOLOGIA BRANCHIALE

Le branchia, oltre ad essere un organo respiratorio, svolge un ruolo fondamentale nel garantire un corretto equilibrio osmotico dell'organismo e nell'escrezione di cataboliti azotati.

-Funzione respiratoria: gli scambi respiratori avvengono attraverso la diffusione dell'ossigeno dall'acqua ai capillari lamellari dove si legano alle molecole di emoglobina dei globuli rossi. Rispetto ad altre specie l'affinità tra O₂ e emoglobina nella trota è molto

bassa, questa specie necessita quindi di alti livelli di ossigeno per la sua sopravvivenza. Durante la respirazione l'acqua entra alla bocca, passa attraverso le branchie ed esce dagli opercoli. Il flusso è mantenuto costante grazie ad un'alternanza di compressione ed espansione tra cavità buccale e opercolare. Il sangue nelle lamelle secondarie scorre in senso opposto rispetto all'acqua, in questo modo l'estrazione controcorrente di ossigeno è massimizzata.

-Funzione osmoregolatrice: le trote, come tutti i pesci dulciacquicoli, sono iperosmotiche rispetto all'ambiente circostante e tendono quindi ad assorbire acqua e perdere ioni attraverso il tratto digerente, la cute e soprattutto tramite le branchie dove è impossibile impermeabilizzare il tessuto. Esistono quindi dei sistemi di regolazione dell'osmolarità che coinvolgono più organi:

- 1) Il rene produce grandi quantità di urina diluita e riassorbe gli elettroliti.
- 2) La cute rimane impermeabile grazie alla produzione di muco.
- 3) Le cellule dei cloruri nelle branchie assorbono i sali persi durante gli scambi respiratori.

-Funzione escretoria: le branchie sono il principale organo di escrezione dei cataboliti azotati derivati dalla degradazione delle proteine. Il più importante di questi composti è l'ammoniaca che viene eliminata per il 65% tramite il tessuto branchiale mentre la restante parte è espulsa attraverso urine e feci. Anche l'anidride carbonica, prodotta dai tessuti e trasportata dal sangue, si diffonde attraverso le branchie per disperdersi nell'ambiente circostante.

1.4.3 PATOLOGIA BRANCHIALE

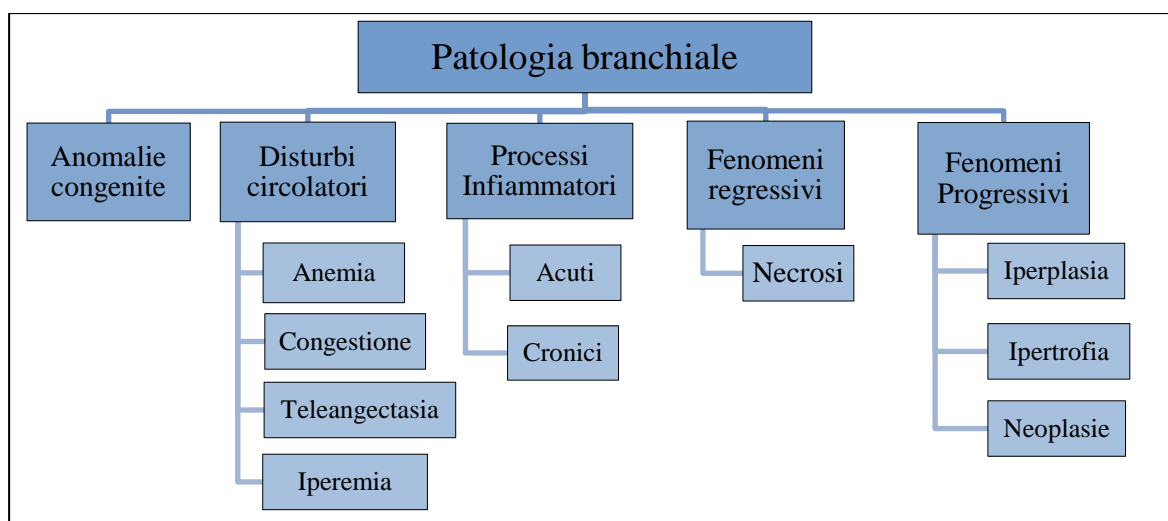
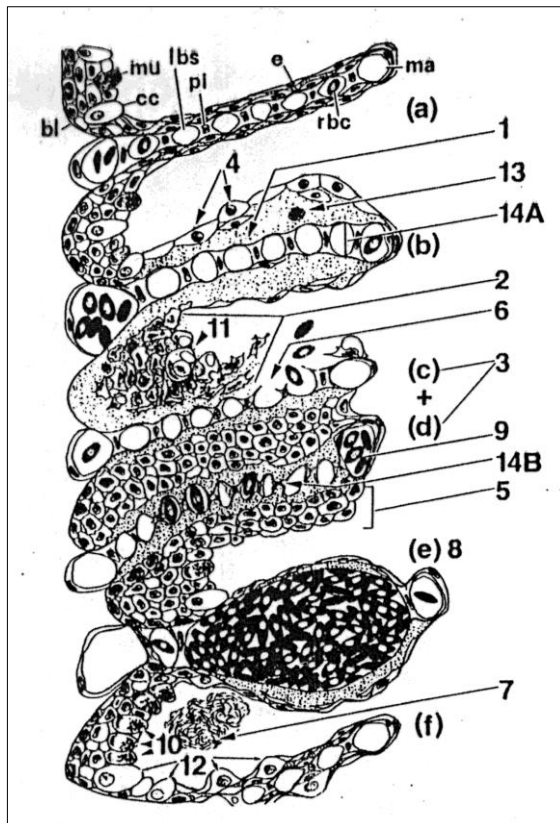


Figura 15: Schema raffigurante le principali categorie delle alterazioni branchiali.



- 1) Edema
- 2) Desquamazione dell'epitelio
- 3) Fusione lamellare per iperplasia
- 4) Ipertrofia
- 5) Iperplasia
- 6) Emorragia
- 7) Ipersecrezione di muco
- 8) Teleangectasia
- 9) Iperemia
- 10) Iperplasia delle cellule mucipare
- 11) Necrosi
- 12) Iperplasia delle cellule del cloruro
- 13) Infiltrazione leucocitaria

Figura 16: Illustrazione delle alterazioni branchiali. Fonte Mallat J. (1985)

Nell'ambito dell'ittiopatologia la malattia branchiale rappresenta una fra le più importanti cause di perdite economiche negli allevamenti. Le malattie respiratorie dei pesci possono essere provocate da agenti biologici (virus, batteri, parassiti e funghi) e da cause chimico-fisiche o carenze nutrizionali. Le patologie infettive e parassitarie possono essere suddivise sulla base delle caratteristiche delle lesioni, in forme proliferative e forme necrotiche.

1.4.3.1 Forma proliferativa

Le patologie branchiali proliferative provocano un'intensa iperplasia delle cellule epiteliali, mucipare e dei cloruri lungo i filamenti e le lamelle branchiali (figura 17).

1.4.3.1.1 Proliferazione delle cellule epiteliali pavimentose

Le patologie branchiali proliferative provocano un'intensa iperplasia delle cellule epiteliali, delle cellule mucipare e delle cellule dei cloruri, lungo i filamenti e le lamelle. Il processo che induce la proliferazione delle cellule dell'epitelio pavimentoso semplice delle branchie non è conosciuto. Similmente non è noto se si tratti di proliferazione delle cellule pavimentose semplici stesse o se la risposta iperplastica sia dovuta alla proliferazione di altre cellule epiteliali (cellule basali del filamento). Tuttavia, l'iperplasia delle cellule

epiteliali è una risposta infiammatoria comune a molti insulti branchiali, in particolare a batteri e parassiti e, in misura limitata, a cause fisiche e chimiche.

Sebbene l'ispessimento della barriera cellulare di scambio fra acqua e capillari possa comportare una riduzione dello scambio gassoso (ossigeno e anidride carbonica) attraverso le branchie, studi hanno dimostrato che questo non si verifica in ogni caso. Infatti nella malattia branchiale batterica (BGD, causata da *Flavobacterium branchiophilum*), anche se vi è spesso estesa iperplasia dell'epitelio dei filamenti e delle lamelle, i valori di PO₂ nel sangue di salmerino di fonte (*Salvelinus fontinalis*) e trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*) affetti, sono relativamente invariati in condizioni di riposo (Byrne et al., 1991; 1995). Una situazione simile, si verifica nella malattia branchiale da amebe (AGD) del salmone atlantico (*Salmo salar*). La malattia branchiale da amebe è la conseguenza della reazione delle branchie al parassita anfigoico *Neoparamoeba* sp. (*N. pemaquidensis* e il *N. branchiphila* recentemente identificati, Dykova et al., 2005). Nonostante le numerose lesioni multifocali iperplastiche dell'epitelio dei filamenti e delle lamelle che possono interessare fino al 80% della superficie ci sono vaste estensioni della branchia inalterate. Il risultato è che la PO₂ del sangue di un pesce a riposo, anche se leggermente diminuita, rimane vicina ai valori di animali sani (Powell et al, 2000; Powell & Nowak, 2003). In condizioni di ipossia la PO₂ di salmoni ammalati equivale a quella dei sani suggerendo che i pesci sono in grado di compensare l'effetto della riduzione della superficie respiratoria nelle porzioni branchiali sane non interessate dal parassita (Powell et al., 2000). Tuttavia pesci affetti da AGD presentano acidosi ematica (Powell et al., 2000; Powell & Nowak, 2003; Leef et al., 2005) per aumento del livello di PCO₂ rispetto ai pesci sani. Questo si verifica come conseguenza della ridotta diffusione ed escrezione di CO₂ attraverso le branchie dei teleostei.

Indicatori di proliferazione cellulare sono raramente riportati negli studi di patologia o di fisiologia delle branchie. Powell et al. (1995) hanno riportato un aumento delle figure mitotiche alla base dell'epitelio dei filamenti in pesci che mostrava ipertrofia ed iperplasia delle cellule del cloruro in risposta all'insulto chimico. Più di recente Adams & Nowak (2003) hanno dimostrato un aumento dell'espressione dell'antigene nucleare di proliferazione (PCNA) nelle cellule epiteliali dei tessuti iperplastici e nel sottostante strato di cellule basali dell'epitelio dei filamenti in branchie di salmone affetti da AGD. Tuttavia, altri tipi cellulari compresi leucociti e cellule granulari eosinofile/mastociti hanno mostrato colorazione positiva per PCNA suggerendo che la proliferazione anche di altre cellule in branchie interessate da AGD (Adams & Nowak, 2003).

1.4.3.1.2 Proliferazione delle cellule mucipare

L'iperplasia delle cellule mucipare è una risposta comune a molte patologie branchiali infettive e non infettive. La produzione di muco svolge un ruolo essenziale nella protezione delle branchie da batterici patogeni e parassiti in qualità di barriera fisica sulla superficie esterna e come risposta immunitaria aspecifica per la presenza di lisozima. In risposta alle infezioni il muco diventa meno viscoso e più abbondante facilitando la rimozione di patogeni adesi all'epitelio (Roberts & Powell, 2005).

Il muco svolge un importante ruolo nella regolazione dell'equilibrio acido-base nel microambiente superficiale delle branchie. Il muco è polianionico e permette il passaggio di anioni trattenendo al suo interno i cationi (Scott, 1989). Le perdite di ioni del cloruro sono superiori a quelle del sodio quando i pesci sono sottoposti ad agenti irritanti le branchie come il cloro (Powell & Perry, 1998).

Il muco è stato, per lungo tempo, considerato una barriera allo scambio di gas attraverso le branchie. Ultsch & Gros (1979) hanno evidenziato, con studi in vitro, che la diffusione dell'ossigeno attraverso lo strato mucoso della carpa (*Cyprinus carpio*) era ritardato. Questo fenomeno non è mai stato dimostrato in vivo.

Lo spessore dello strato mucoso è costituito dal glicocalice cellulare (componente extracellulare mucopolisaccaridica di proteine glicosilate nelle membrane delle cellule epiteliali) e dal muco stesso, secreto dalle cellule mucipare.

Il rivestimento mucoso può variare in spessore in relazione alle condizioni ambientali e allo stato di salute del pesce.

Powell et al. (1998) hanno dimostrato che trote iridee con iperplasia delle cellule mucipare riuscivano a mantenere livelli di O₂ ematico simile a quello di individui sani mentre i livelli di escrezione CO₂ erano influenzati dalla secrezione mucosa (Powell & Perry, 1999). Queste osservazioni confermano l'ipotesi che l'anidride carbonica escretta sia influenzata primariamente dalla diffusione attraverso lo strato di muco mentre l'assorbimento di ossigeno dipenda dalla perfusione delle lamelle branchiali (Malte & Weber, 1985).

E' necessario comunque precisare che in ipersecrezioni mucose intense, in seguito ad intossicazioni acute, così come da cloruri o metalli, sono state riscontrate riduzioni nell'assorbimento di ossigeno (Fernandes & Mazon, 2003).

1.4.3.1.3 Proliferazione delle cellule del cloruro

Le cellule del cloruro, definite anche cellule ricche di mitocondri, sono coinvolte nella regolazione ionica e nell'equilibrio acido-basico. Disfunzioni dell'equilibrio acido-basico e della ionoregolazione, in conseguenza di cause non infettive, possono indurre iperplasia delle cellule del cloruro (Fernandes & Mazon, 2003).

La proliferazione cellulare ostacola la diffusione di gas. Questo suggerisce che l'iperplasia delle cellule dei cloruri possa avere un ruolo significativo nella fisiologia respiratoria, in particolare nell'escrezione di CO₂.

L'iperplasia delle cellule dei cloruri non è spesso riportata come conseguenza diretta di patologie infettive, ma è la risultanza di squilibri ionici o stress osmotico correlati all'infezione. Ad esempio, in corso di infestazioni da *Ichthyophthirius multifiliis* nella trota iridea, le erosioni epiteliali causate dal parassita provocano una perdita di cloruri plasmatici con conseguente iperplasia delle cellule dei cloruri che tendono a compensare le perdite ioniche (Ewing et al., 1994). Fenomeno simile è stato osservato anche durante infestazioni di microsporidi (*Loma salmonae*) nella trota iridea (Powell et al., 2006).

1.4.3.1.4 Proliferazione delle cellule X

L'origine delle cellule X e l'eziologia alla base dei fenomeni iperplastici di queste cellule non sono ancora stati chiariti. Alcuni autori ipotizzano una eziologia virale con aspetti cancerogeni. Studi sull'iperplasia delle cellule X sono stati effettuati su *Pagothernia borchgrevinki*, specie ittica particolarmente suscettibile a questa alterazione.

La lesione è caratterizzata da intensa iperplasia delle cellule X, di aspetto granuloso, nell'epitelio del filamento che porta ad una progressiva occlusione dei vasi sanguigni branchiali e delle lacune lamellari con seguente riduzione degli scambi gassosi.

E' stato dimostrato che la proliferazione delle cellule X comporta una riduzione dell'assorbimento di ossigeno (Frankling et al., 1993).

Le misurazioni di pressione dell'aorta ventrale hanno evidenziato che, in corso di iperplasia delle cellule X, aumenta la resistenza vascolare periferica (Davidson & Frankling, 2003). I livelli di CO₂ ematici tendono ad aumentare durante tale alterazione patologica portando ad acidosi respiratoria.

1.4.3.2. Forma necrotica

La forma di malattie branchiale necrotica, è caratterizzata da una forte erosione delle lamelle e dei filamenti, a carattere focale o diffuso, causata da batteri (principalmente mixobatteri) e parassiti (figura 18). Per compensare alle difficoltà respiratorie, provocate dalla riduzione della superficie branchiale, i pesci aumentano il tasso di ventilazione (Hughes & Nyholm, 1979) e la perfusione al livello branchiale (Powell et al., 2005).

I pesci colpiti dalla forma necrotica di malattia branchiale muoiono per squilibri nell'osmoregolazione prima che si manifesti un'insufficienza respiratoria (Powell et al., 2004; 2005).

1.4.3.3 Stiramento dell'epitelio lamellare

Il distacco dell'epitelio dalla membrana basale delle cellule a pilastro è un segno patologico comune, correlabile a intossicazioni chimiche, ipossia acuta, malattia da gas, anestesi e degenerazioni post mortali (Speare & Ferguson, 1989; Munday & Jaisankar, 1998). La conseguenza della lesione è la formazione di uno spazio interposto, con un aumento della distanza di diffusione del gas fra sangue e acqua che compromette gli scambi respiratori delle branchie (figura 19).

Lo scollamento epiteliale in branchie cavalluccio marino si verifica a seguito di esposizione a concentrazioni elevate di nitriti ed ammoniaca (Adams, 1999).

1.4.3.4. Alterazioni circolatorie

1.4.3.4.1 Aneurisma

Lo sviluppo di aneurismi è stato riportato in risposta ad insulti chimici (Fernandes & Mazon, 2003), malattie infettive e parassitarie. Aneurismi sono dilatazioni e sfiancamenti dei capillari branchiali con formazioni di lacune di sangue. La lesione può derivare da occlusione vascolare dei vasi sanguigni efferenti. La forma acuta dell'aneurisma è denominata telangiectasia (figura 20).

Le telangiectasie, riscontrate all'istologia, talvolta possono essere conseguenti ad eutanasia, quando i pesci sono soppressi con un corpo contundente sul cranio e ad abrasioni da trauma branchiale acuto (Powell et al., 2004; 2005).

1.4.3.4.2 Iperemia e Congestione

Iperemie, congestioni branchiali possono essere la conseguenza di alterazioni circolatorie che inducono ipossiemia acuta (figure 21 e 22). L'esposizione a sostanze tossiche

ossidative (cloro, perossido di idrogeno, ecc.) inducono necrosi e squilibri osmotici ionici nel sangue (Powell & Perry, 1997; Powell & Harris, 2004). Iperemia e congestione sono caratterizzate da accumulo e raccolte di eritrociti nei vasi afferenti ed efferenti del filamento e nei capillari delle lamelle. Iperemie e congestioni delle branchie possono essere conseguenti a patologie infettive (Adams & Nowak, 2004).

1.4.3.4.3 Emorragia

Perdita di sangue dall'apparato circolatorio per lesioni ai vasi branchiali o per malattie emorragiche (figura 23).

1.4.3.4.4 Anemia

L'Anemia branchiale è la riduzione degli eritrociti nel sangue e può essere conseguente a parassiti ematofagi, malattie infettive, emorragie ed emolisi.

1.4.3.4.5 Trombi ed Emboli

Formazioni di corpi occludenti all'interno dei vasi branchiali che ostacolano od impediscono la normale circolazione. I trombi e gli emboli possono avere varie origini: endogena, batterica o gassosa (figura 24).

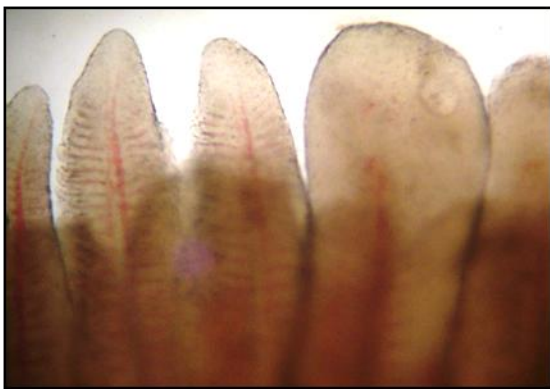


Figura 17: Filamenti iperplastici.



Figura 18: Filamenti necrotici.



Figura 19: Scollamento epiteliale, (E-E).

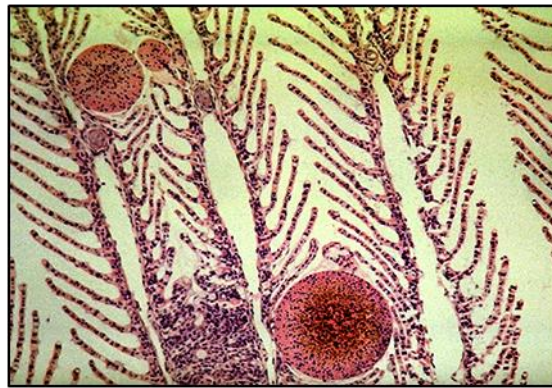


Figura 20: Teleangectasie lamellari, (E-E).

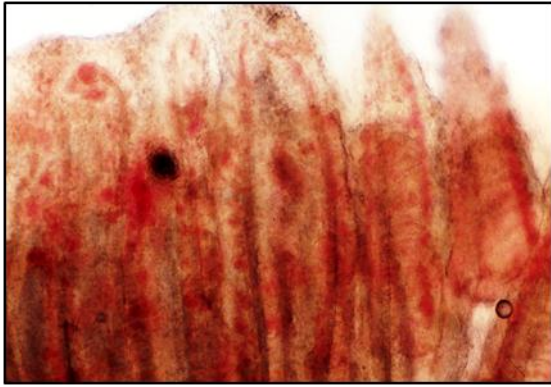


Figura 21: Iperemia branchiale.

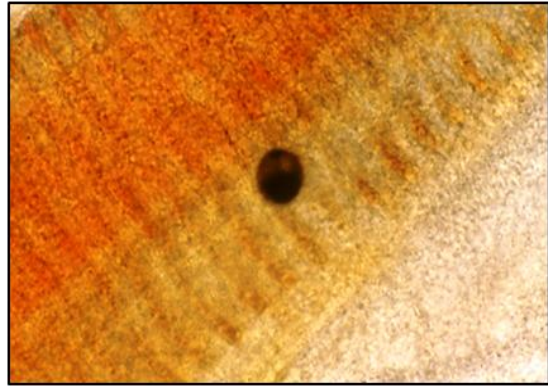


Figura 22: Congestione del filamento da *Oodinium* sp.

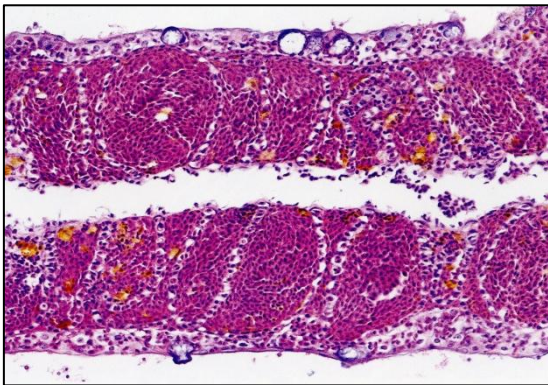


Figura 23: Emorragie branchiali, (E-E).

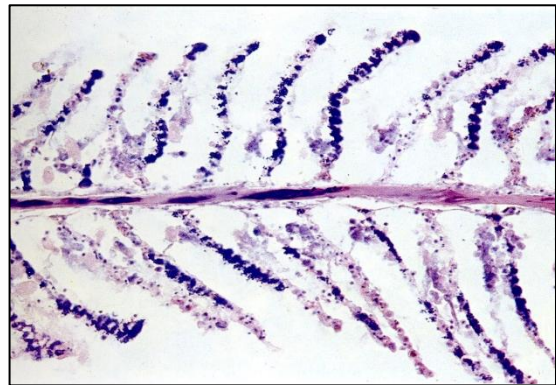


Figura 24: Trombi batterici lamellari, (E-E)

1.5 PRINCIPALI PATOLOGIE BRANCHIALI

1.5.1 FLAVOBATTERIOSI

Al genere *Flavobacterium* appartengono numerose specie di batteri bacillo-filamentosi Gram negativi dotati di enzimi proteolitici che provocano estese alterazioni tissutali. Negli allevamenti di trota assumono particolare importanza la flavobatteriosi d'acqua fredda sostenuta da *Flavobacterium psychrophilum* e la favobatteriosi branchiale causata da *Flavobacterium branchiophila*.

La flavobatteriosi d'acqua fredda colpisce la trota iridea durante tutto il ciclo produttivo con sintomi differenti per età. Il microorganismo nelle uova embrionale provoca un rammollimento del guscio; negli avannotti alla schiusa determina un idrope e mancato riassorbimento del sacco vitellino; nelle trotelle sotto i cinque grammi si manifesta in forma sistemica con letargia, anoressia, melanosi, anemia, necrosi branchiale e splenomegalia; in pesci di taglie superiori induce una forma cutanea con una discromia superficiale che evolve in erosioni ed ulcera profonda.

I pesci colpiti da *Flavobacterium branchiophila* presentano sintomatologia respiratoria riconducibile a malattia branchiale. Le trote nuotano in superficie e mantengono gli opercoli divaricati, mostrando branchie anemiche, rigonfie e ipersecrezione di muco.

All'esame istologico si nota una perdita della struttura arboriforme della branchia causata da un'intensa iperplasia epiteliale che provoca fusione delle lamelle e, nei casi più gravi, dei filamenti stessi. Alla colorazione di Gram si possono osservare masse di batteri filamentosi Gram negativi, corrispondenti ai flavobatteri, adesi o in prossimità delle lamelle.

La forma di flavobatteriosi branchiale è stata considerata per molto tempo la causa primaria dello sviluppo della malattia branchiale. Alcuni autori ritengono che i flavobatteri siano dei patogeni secondari opportunisti che aggravano le lesioni di branchie irritate da altri fattori (Borroni & Bovo, 2007).

1.5.2 COSTIASI

Patologia provocata da *Ichthyobodo necator* (*Costia necatrix*), protozoo flagellato che colpisce numerose specie ittiche d'acqua dolce e marina, a temperature che variano dai 2°C ai 28°C, con un range ottimale compreso tra i 10°C e i 25°C. Parassita obbligato, a ciclo biologico diretto, mantiene una morfologia ovoidale nell'acqua per poi assumere un aspetto piriforme quando si attacca alle cellule epiteliali della cute e delle branchie dell'ospite.

In seguito all'adesione alla superficie corporea il cistosoma penetra nel citoplasma della cellula ospite con effetto tossico. In condizioni ambientali particolarmente sfavorevoli il parassita può incistarsi. A livello cutaneo la costiasi induce reazioni iperplastiche, edemi e fenomeni degenerativi. Nelle branchie si osserva iperproduzione di muco, iperplasia epiteliale con fusione delle lamelle.

Particolarmente infestate sono le avannotterie delle trotecolture, soprattutto in situazioni di alta densità e scarsa igiene ambientale. La sintomatologia si manifesta in soggetti giovani od immunocompromessi. Con infestazioni lievi le trote si limitano a strofinarsi lungo la superficie delle vasche e si alimentano meno mentre nelle forme più gravi si nota ipermelanosi, alterazioni cutanee, dimagrimento ed atteggiamento dispnoico. La morte sopraggiunge per asfissia o per impossibilitata osmoregolazione, dovuta necrosi dell'epidermide e dell'epitelio branchiale (Fioravanti & Caffara, 2007).

1.5.3 ICTIOFTIRIASI

Malattia parassitaria sostenuta da *Ichthyophthirius multifiliis*, protozoo ciliato che colpisce molte specie ittiche d'acqua dolce. L'ictioftiriasi può manifestarsi in acque tra i 3°C e 29°C, con temperature ottimali 20°C ai 25°C.

Durante il ciclo biologico, il parassita nella sua forma infettante, detta teronte, nuota libero nell'acqua per poi attaccarsi e penetrare nell'epitelio superficiale dell'ospite ove incistato evolve in trofante. Il trofante si accresce tra gli strati epiteliali. A sviluppo completato, la cisti si rompe e il trofante si libera in acqua depositandosi sul fondale dove, raggiunto lo stadio di tofante, si divide per scissione binaria all'interno di una parete cistica formando i tomiti. I tomiti mutano in teronti e fuoriescono dalla cisti, ricominciando il ciclo.

L'ictioftiriasi provoca gravi reazioni iperplastiche, iperproduzione di muco, atrofia e necrosi epiteliale. Le rotture delle cisti esitano in piccole ulcere che possono fungere come via di penetrazione per infezione secondarie. Macroscopicamente è possibile riconoscere le infestazioni da ictioftiriasi grazie alla presenza di una punteggiatura cutanea, di circa un millimetro, biancastra e diffusa. Le trote infette si strofinano lungo le pareti della vasca, non si alimentano e, se interessate anche le branchie, assumono un atteggiamento asfittico (Fioravanti & Caffara, 2007).

1.5.4 MALATTIA DA GAS

La malattia da gas è causata da una sovrasaturazione di gas disciolti nell'acqua, in particolare: Azoto, CO₂, Argon, Radon e Metano.

La sovrasaturazione gassosa, con implicazioni negative in piscicoltura, è un fenomeno che riguarda soprattutto le acque sotterranee (Ghittino, 1985). Questa situazione si viene a manifestare quando la pressione parziale di uno o più gas diventa superiore a quella dell'atmosfera. Sangue e tessuti del pesce raggiungono un equilibrio con l'ambiente circostante, pertanto, se questo è sovrasaturato, lo sarà anche il sangue.

Quando la pressione dei gas presenti nell'acqua cala rapidamente (per rapida degasazione o cambi di temperatura improvvisi) si creano emboli gassosi all'interno del circolo sanguigno.

Sono particolarmente a rischio di sviluppare malattia da gas le trotilture che utilizzano direttamente acque di pozzo o sorgiva senza una preventiva degassificazione su superfici grigliate.

La patologia può manifestarsi in forma acuta senza segni clinici esterni, responsabile di mortalità improvvise per emboli gassosi nel torrente circolatorio (figura 25).

Facilmente diagnosticabile è la forma enfisematosa, a decorso lento, per la presenza di bolle gassose sottocutanee sulla superficie del capo, pinne, opercoli branchiali e connettivo perioculare, spesso accompagnata da esoftalmo (Ghittino, 1985).

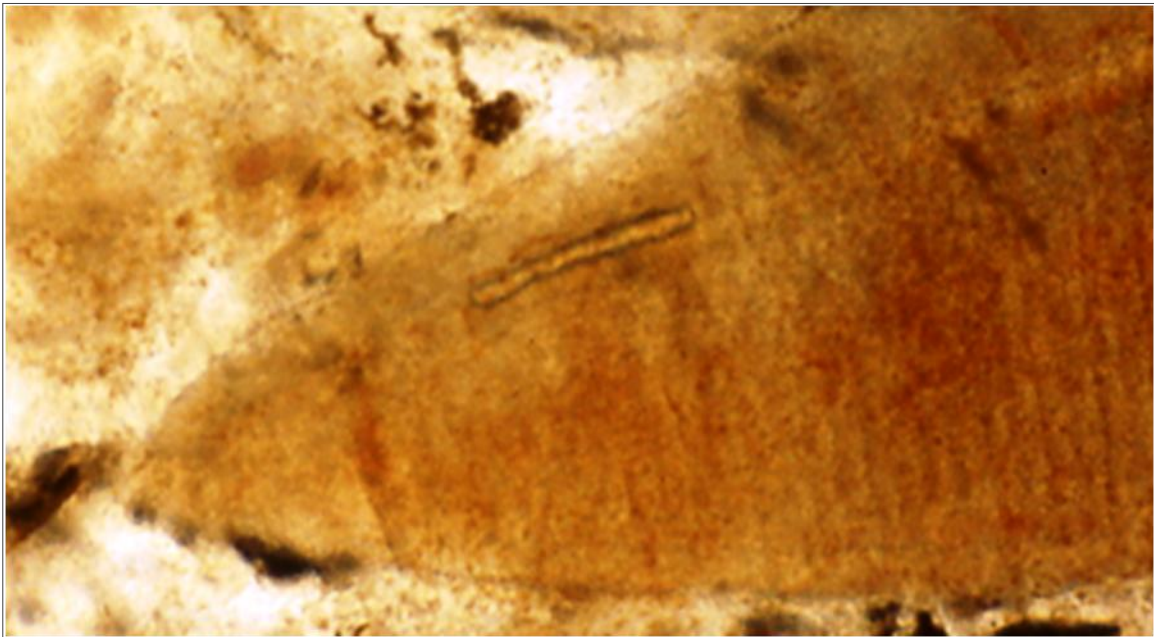


Figura 25: Malattia da gas con embolo gassoso all'interno del filamento.

Negli avannotti alla schiusa, dove la mortalità può essere molto elevata, con enfisema del sacco vitellino e presenza di una bolla in cavità orale. Soggetti giovani manifestano anche un atteggiamento natatorio atipico in cui assumono posizione verticale con capo rivolto verso l'alto o posizione laterale ed in superficie (Rucker & Kangas, 1974).

All'esame microscopico si osservano emboli gassosi nei vasi sanguigni ed edema branchiale, enfisemi diffusi in vari tessuti e timpanismo della vescica natatoria. E' stata riscontrata, specialmente nei soggetti giovani, una correlazione diretta tra malattia da gas e malattia branchiale (Wetkamp & Katz, 1980).

1.5.5 MALATTIA BRANCHIALE POLIFATTORIALE

Grave patologia a carico dell'apparato respiratorio della trota iridea ad eziologia multifattoriale, segnalata in Italia già negli anni sessanta (Ghittino, 1967).

Viene considerata una delle principali cause di mortalità negli allevamenti intensivi di salmonidi, specialmente negli stadi giovanili.

Le cause eziologiche della malattia branchiale sono varie e sinergiche tra loro, tra le principali ricordiamo le cause tossico-ambientali (ammoniaca, solidi in sospensione, bassi livelli di ossigeno, temperatura elevata e sovrassaturazione di gas), batteriche

(*Flavobacterium branchiophila*), parassitarie da protozoi (*Ichthyophthirius multifiliis*, *Costia necatrix* e *Trichodina spp.*) e da trematodi monogenei (generi *Girodactylus* e *Dactylogyru*s), alimentari (mangimi polverosi) e stressogene (Borroni & Bovo, 2007).

Le trote affette manifestano una tipica sintomatologia da difficoltà respiratoria mantenendo gli opercoli divaricati, nuotando in superficie o all'ingresso dell'acqua per assumere la maggior quantità di ossigeno disponibile. Sono stati descritti anche casi di atassia natatoria (movimenti lenti a spirale e verso il fondo) ed addome rigonfio in soggetti affetti da malattia branchiale (Ghittino, 1985).

Macroscopicamente e microscopicamente a fresco le branchie interessate si presentano con aspetto rigonfio, anemico o congesto e sono ricoperte da un'abbondante quantità di muco. Sono osservati anche quadri telangectasia e necrosi con sfaldamento cellulare.

2 PARTE SPERIMENTALE

2.1 OBIETTIVO DELLA RICERCA

A partire dal 2012, nelle trote iridee allevate in provincia di Trento si è verificato un significativo aumento della mortalità, associata ad una sintomatologia respiratoria. I pesci colpiti presentavano opercoli divaricati che permettevano di osservare le branchie di aspetto anemico, rigonfie e con abbondante rivestimento mucoso. Le trote nuotavano in superficie e si addensavano nel settore iniziale delle vasche dove l'acqua in entrata era più ricca di ossigeno.

La sintomatologia era comune alla malattia branchiale tradizionale ad eziologia batterica e polifattoriale, descritta in Italia negli anni sessanta (Ghittino, 1967). Le differenze tra la vecchia e la nuova forma di patologia branchiale consistevano nella maggiore gravità delle lesioni, della mortalità e del periodo di insorgenza. Gli allevatori riferivano di un repentino aumento delle perdite durante i mesi invernali quando la temperatura risultava sotto 10 °C. La malattia branchiale batterica polifattoriale colpisce durante i mesi estivi quando i livelli di ossigeno dell'acqua sono più bassi e inquinamento organico è più elevato. Gli episodi di mortalità nelle trotecolture trentine si sono verificati per un periodo di circa due o tre mesi iniziando in tardo autunno per ridursi gradualmente in primavera. In alcuni allevamenti, in controtendenza, sono state riscontrate gravi perdite anche durante i mesi estivi.

La sintomatologia si presentava dopo alcune settimane dall'introduzione dei pesci nelle vasche da ingrasso. La malattia si manifestava più frequentemente in trote di taglia compresa tra i 20g e i 100g, ed in alcuni casi anche in soggetti di peso superiore, provocando gravi perdite economiche.

All'esame anamnestico molti allevatori hanno affermato che questa nuova forma di malattia branchiale interessava singole vasche di impianto per poi risolversi senza ricadute. Le perdite sono state stimate intorno al 60% dei soggetti per vasca ma in alcuni casi potevano essere superiori (figura 26). La mortalità in trote di taglia commerciale provocava i maggiori danni economici.



Figura 26: Trote iridee morte ed addossate alla griglia di scarico.

Le perdite economiche oltre alla mortalità erano dovute anche al mancato accrescimento ponderale. Trote con difficoltà respiratorie si alimentano meno e vi è un peggioramento dell'indice di conversione alimentare. Per raggiungere la taglia commerciale si allunga il ciclo di allevamento con un ulteriore aggravamento dei costi di produzione. Le trote colpite da malattia branchiale risultavano immunodepresse ed erano più suscettibili ad altre malattie.

In conseguenza all'insorgenza di questa nuova forma di patologia branchiale sono stati programmati campionamenti allo scopo di individuare l'eziologia.

2.2 MATERIALI E METODI

2.2.1 PRIMA FASE DI MONITORAGGIO

La ricerca si è svolta inizialmente in cinque allevamenti della provincia di Trento che riferivano aumenti di mortalità con sintomatologia branchiale. Quattro di essi sono nel comprensorio delle Valli Giudicarie ed uno nell'alto bacino idrografico del fiume Brenta (figura 27 e 28).

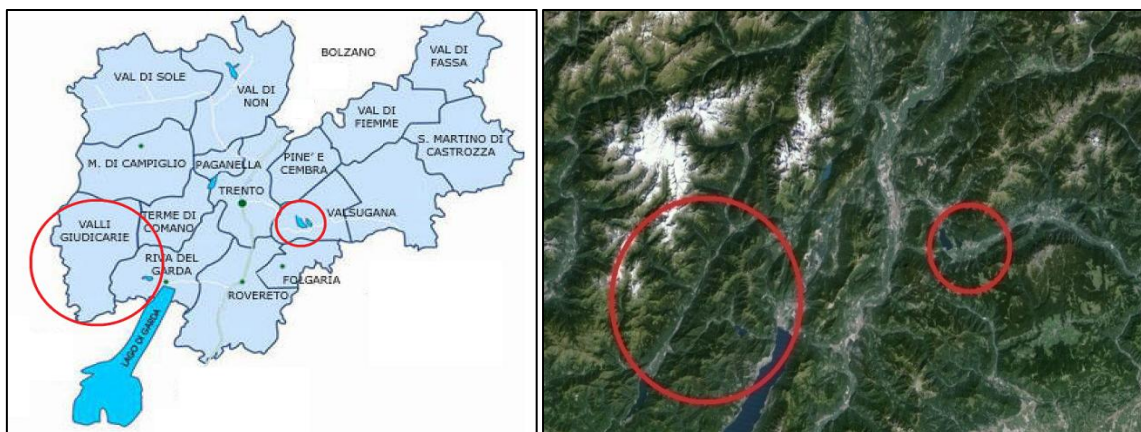


Figura 27 e 28: Area di provenienza degli allevamento oggetto del primo monitoraggio.

L'indagine è iniziata a febbraio 2014 per terminare a fine aprile dello stesso anno, con un prelievo mensile nelle vasche oggetto di indagine (tabella 1). Durante tale periodo tre trottocolture nelle Valli Giudicarie (figura 29, 30, 31) sono state monitorate a febbraio marzo e aprile. La quarta trottocoltura, situata nello stesso comprensorio delle precedenti (figura 32), e la quinta (figura 33), nell'alto bacino del fiume Brenta, sono state monitorate nel mese di marzo.

Tabella 1: Prima campagna di monitoraggio: allevamenti, area geografica degli stabilimenti, vasche oggetto di indagine, durata del monitoraggio, numero di trote prelevate ogni mese e peso medio dei pesci per vasca.

Allev.	Area	Vasca	Periodo monitoraggio	Numero delle trote prelevate per mese	Peso medio delle trote prelevate (grammi)
1	Giudicarie	A	Febbraio, Marzo e Aprile	6-6-6	62 g
1	Giudicarie	B	Febbraio, Marzo e Aprile	6-6-6	55 g
2	Giudicarie	C	Febbraio, Marzo e Aprile	6-6-6	16 g
2	Giudicarie	D	Febbraio, Marzo	6-6	52 g
3	Giudicarie	E	Febbraio, Marzo e Aprile	4-5-5	39 g
4	Giudicarie	F	Marzo	6	91 g
4	Giudicarie	G	Marzo	4	110 g
5	Alto Brenta	H	Marzo	10	59 g

Il monitoraggio ha riguardato trote di sette vasche di quattro allevamenti nelle Valli Giudicarie che riportavano mortalità in atto riferibile a malattia branchiale e soggetti di una

vasca in Valsugana con sospetto di malattia branchiale senza mortalità. Nelle trotticoleture monitorate sono stati eseguite analisi dei parametri dell'acqua, esami anamnestici, clinici, necroscopici, microscopici a fresco, batteriologici ed istologici.



Figura 29: Allevamento 1.



Figura 30: Allevamento 2.



Figura 31: Allevamento 3.



Figura 32: Allevamento 4.



Figura 33: Allevamento 5.

2.2.1.1 Esame Clinico in allevamento

In ognuno dei cinque allevamenti oggetto di indagine è stato effettuato un esame anamnestico dove è stato riferito il periodo di inizio della sintomatologia, mortalità correlata, taglia dei pesci colpiti, andamento della mortalità nel tempo, approvvigionamento idrico e derivazione delle acque per vasca di indagine, condizioni ambientali e gestionali recenti, patologie concomitanti e trattamenti effettuati.

Sono state fatte osservazioni cliniche delle trote in vasca per esaminare la sintomatologia respiratoria ed altri segni o atteggiamenti particolari. Un'attenta osservazione delle strutture è stata effettuata per valutare la presenza o meno di solidi sospesi in acqua e di materiale organico sul fondo. Sulla base delle osservazioni sono state individuate le vasche dove effettuare i campionamenti.

2.2.1.2 Analisi dei parametri fisico-chimici dell'acqua

Le analisi chimico-fisiche dell'acqua, condotte in tutte le vasche che presentavano mortalità di trote con sintomatologia branchiale, sono state: ossigeno, ammoniaca, nitriti, pH e temperatura. In strutture di tipo "raceway", caratterizzate da una lunghezza elevata, i parametri chimico-fisici sono stati condotti a monte, all'ingresso dell'acqua, ed a valle in prossimità delle griglie di scarico. In due vasche quadrangolari degli allevamenti 4 e 5 i prelievi sono stati effettuati solo in prossimità della griglia a causa delle caratteristiche strutturali.

L'Ossigeno disciolto è stato rilevato con ossimetro HANNA Instruments modello HI9143 tramite una sonda sommersa. Le misurazioni, fatte in compensazione dell'altitudine dell'allevamento, sono state riportate sia in forma di percentuale di ossigeno disciolto che come milligrammi per litro (mg/L). Con lo stesso strumento è stata misurata la temperatura dell'acqua.

Il valore del pH è stato misurato mediante cartine tornasole Macherey-Nagel per valori compresi tra 5.5 e 9. L'acqua veniva prelevata con una provetta sterile in cui era simultaneamente immersa la cartina tornasole.

I livelli di ammoniaca totale in vasca sono stati rilevati con un fotometro portatile della HANNA Instruments modello HI96715-03 Ammonia medium range. Tale valore ottenuto è stato convertito nella forma in dissociata (tossica per il pesce) seguendo la tabella 2.

Tabella 2: Variabili per calcolare l'ammoniaca indissociata in funzione della temperatura e del pH.

	6	6,5	7	7,5	8	8,5
0	0,00827	0,0261	0,0826	0,261	0,820	2,55
1	0,00899	0,0284	0,0898	0,284	0,891	2,77
2	0,00977	0,0309	0,0977	0,308	0,968	3,00
3	0,0106	0,0336	0,106	0,335	1,05	3,25
4	0,0115	0,0364	0,115	0,363	1,14	3,52
5	0,0125	0,0395	0,125	0,394	1,23	3,80
6	0,0136	0,0429	0,135	0,427	1,34	4,11
7	0,0147	0,0464	0,147	0,462	1,45	4,44
8	0,0159	0,0503	0,159	0,501	1,57	4,79
9	0,0172	0,0544	0,172	0,542	1,69	5,16
10	0,0186	0,0589	0,186	0,586	1,83	5,56
11	0,0201	0,0637	0,201	0,633	1,97	5,99
12	0,0218	0,0688	0,217	0,684	2,13	6,44
13	0,0235	0,0743	0,235	0,738	2,30	6,92
14	0,0254	0,0802	0,253	0,796	2,48	7,43
15	0,0274	0,0865	0,273	0,859	2,67	7,97
16	0,0295	0,0933	0,294	0,925	2,87	8,54
17	0,0318	0,101	0,317	0,996	3,08	9,14
18	0,0343	0,108	0,342	1,07	3,31	9,78
19	0,0369	0,117	0,368	1,15	3,56	10,5
20	0,0397	0,125	0,396	1,24	3,82	11,2

In base alla temperatura e al pH riscontrati, il valore corrispondente nella tabella sopra riportata viene convertito in una frazione decimale (/100) e moltiplicato per l'ammoniaca totale (mg/l) ottenendo il valore dell'ammoniaca indissociata (mg/l).

L'analisi dei nitriti è stata eseguita con un kit colorimetrico Merck Millipore codice 1.08025.0001.

2.2.1.3 Campionamento di trote per vasca

Nei cinque allevamenti monitorati sono state prelevate, con cadenza mensile, sei trote per vasca, vive o moribonde (tabella 1). Nelle vasche "raceway" negli allevamenti n°1, 2 e 3 le trote sono state pescate all'ingresso dell'acqua ed in prossimità della griglia di scarico. Negli altri allevamenti n°4 e 5, che presentavano strutture con lunghezza ridotta, veniva fatto solo un prelievo in griglia.

2.2.1.4 Esame Microscopico a fresco

Le trote campionate sono state pesate e sottoposte ad esame microscopico a fresco da raschiato cutaneo, mediante microscopio ottico, per rilevare l'eventuale presenza di patogeni. Dopo la rimozione dell'opercolo le branchie sono state esaminate macroscopicamente prendendo come riferimento la metodica di valutazione proposta da Taylor et al. (2009). Il primo arco branchiale esterno destro di ogni trota è stato asportato ed osservato a fresco con microscopio ottico.

2.2.1.5 Esame Necroscopico

Su tutti i campioni è stato effettuato un esame necroscopico per valutare lo stato di salute ed evidenziare eventuali lesioni da patologie concomitanti alla malattia branchiale.

2.2.1.6 Esame Batteriologico

Dall'arco branchiale sinistro più esterno di i soggetti campionati sono stati prelevati alcuni filamenti per l'esame batteriologico. Il prelievo è stato eseguito previa sterilizzazioni degli strumenti su fiamma onde evitare contaminazione microbica. Le porzioni di tessuti branchiale sono state immerse in provette contenenti 5 ml di Anacker Ordal Broth ed inviate all'Istituto Zooprofilattico delle Venezie sede di Adria entro 48 ore, mantenendo la temperatura tra 5 e i 15°C.

Dalle provette sono stati prelevati 30 µl di liquido seminati per inclusione su piastre con Anacker Ordal Agar Enriched (Anacker Ordal Agar arricchito con siero fetale bovino al 10%), terreno selettivo per le Flavobacteriaceae. I campioni sono stati incubati per 10 giorni alla temperatura di 15°C.

In seguito allo sviluppo batterico sono state isolate colonie di colore giallo a margini netti o irregolari sospette per *Flavobacterium psychrophilum*. Le colonie sono state osservate con microscopio a contrasto di fase a 400 ingrandimenti, valutando la morfologia e la motilità (gliding motility) dei batteri. I microrganismi sono stati sottoposti a colorazione di Gram ed osservati al microscopio ottico.

E' stata allestita una PCR sulle colonie, utilizzando primers specifici per *Flavobacterium psychrophilum* (Urdaci et al., 1998; Del Cerro et al., 2002) e primers degenerati per individuare batteri appartenenti alla famiglia delle Flavobatteriaceae. Gli ampliconi ottenuti sono stati sottoposti a sequenziamento.

Le sequenze ottenute, rappresentate in formato FASTA, sono state analizzate e caratterizzate per mezzo del software BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

2.2.1.7 Esame Istologico

L'arco branchiale esterno sinistro di tutti i campioni prelevati è stato asportato per l'esame istologico, fissato in formalina tamponata al 10% ed incluso in paraffina. Sezioni di 4 μm sono state colorate con Ematossilina ed Eosina, Tricromica di Masson, PAS (acido periodico-reattivo di Schiff), Feulgen, Ziehl-Neelsen e Giemsa (figure 34, 35, 36, 37, 38 e 39). I campioni sottoposti a colorazione di Giemsa sono stati valutati all'esame istologico prendendo come riferimento la classificazione proposta da Clark & Nowak (1999).



Figura 34: Colorazione Ematossilina-Eosina.

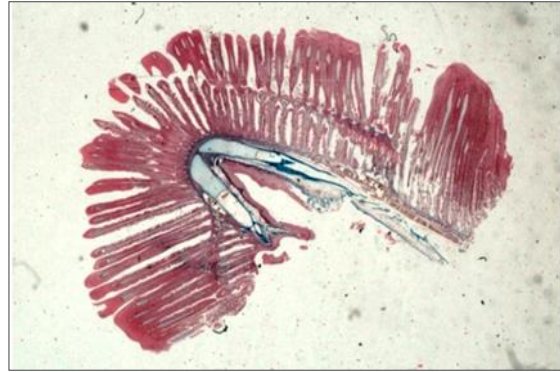


Figura 35: Colorazione Tricromica di Masson.



Figura 36: Colorazione di PAS.

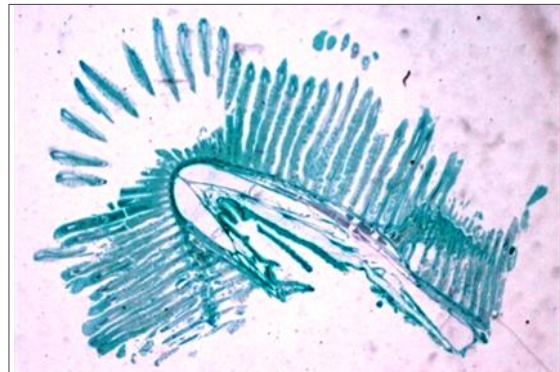


Figura 37: Colorazione di Feulgen.

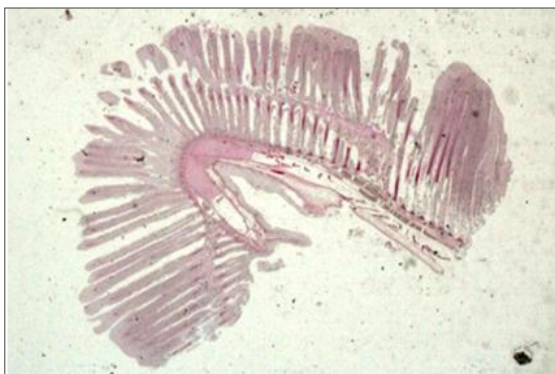


Figura 38: Colorazione Ziehl-Neelsen

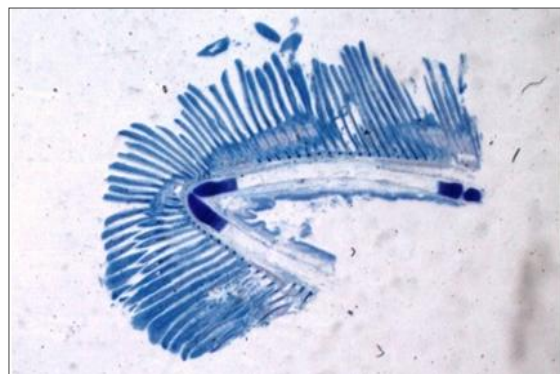


Figura 39: Colorazione di Giemsa

2.2.1.8 Esame Parassitologico

In seguito alle osservazioni istologiche per una sospetta presenza di amebe è stato effettuato un esame parassitologico.

Durante il mese di aprile sono state prelevate venticinque trote appartenenti alle due vasche dell'allevamento 1 (A e B) che presentavano elevate mortalità da malattia branchiale. Tali campioni sono stati inviati in giornata presso Laboratorio di Ittiopatologia del Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie dell'Università di Bologna dove è stato eseguito un esame parassitologico.

Porzioni di branchia sono state seminate su piastre Trypticase Soy Agar precedentemente inoculate con un ceppo di *Escherichia coli*. I terreni di coltura sono rimasti in incubazione al buio per 24-48 ore alla temperatura di 18-20°C per essere esaminati al microscopio.

2.2.2 SECONDA FASE DI MONITORAGGIO

Sono state condotte indagini istologiche su 54 vasche di 11 trotilture della Provincia di Trento (incluse le cinque della prima fase di monitoraggio) e da due vasche rispettivamente in una trotiltura Veneto (TV) ed una nelle Marche (MC) dove si segnalavano episodi di mortalità correlabili alla malattia branchiale.

Gli allevamenti trentini erano siti in Comunità delle Giudicarie, Comunità dell'Alto Garda e bacino dell'Alto Brenta. I campionamenti hanno avuto luogo da dicembre 2013 ad aprile 2015 come riportato in tabella 3. Alcuni campioni branchiali erano stati prelevati e conservati in formalina antecedentemente l'inizio della ricerca.

Durante la seconda fase di monitoraggio sono stati prelevati e sottoposti ad indagine complessivamente 494 archi branchiali, da un corrispondente numero di trote, su cui è stato eseguito il solo esame istologico previa colorazione di Giemsa.

Tabella 3: Seconda campagna di monitoraggio: Allevamenti e vasche oggetto di indagine, periodo dei campionamenti e numero di trote prelevate per vasca.

Allev.	Area	Vasche monitorate	Periodo monitoraggio e N° trote prelevate per mese
1	Giudicarie (TN)	A	2013: Dic(14) 2014: Gen(9) Feb(6) Mar(6) Apr(6)
1	Giudicarie (TN)	B	2014: Feb(6) Mar(6) Apr(6)
1	Giudicarie (TN)	1a	2014: Dic(7) Gen(18)
1	Giudicarie (TN)	1b	2014: Ott(6)
1	Giudicarie (TN)	1c	2014: Nov(6) Dic(6)
1	Giudicarie (TN)	1d	2014: Apr (5)
2	Giudicarie (TN)	C	2014: Feb (6) Mar(6) Apr(6)
2	Giudicarie (TN)	D	2014: Gen (8) Feb(6) Mar(6)
2	Giudicarie (TN)	2a	2014: Ago(6)
2	Giudicarie (TN)	2b	2014: Ott (5)
2	Giudicarie (TN)	2c	2014: Nov(6)

Allev.	Area	Vasche monitorate	Periodo monitoraggio e N° trote prelevate per mese
3	Giudicarie (TN)	E	2014: Feb(4) Mar(5) Apr(5)
3	Giudicarie (TN)	3a	2014: Dic(8)
4	Giudicarie (TN)	F	2014: Mar(6)
4	Giudicarie (TN)	G	2014: Mar(4)
4	Giudicarie (TN)	4a	2014: Apr(4)
4	Giudicarie (TN)	4b	2014: Ago(6)
4	Giudicarie (TN)	4c	2014: Ago(11)
4	Giudicarie (TN)	4d	2014: Sett(5) Ott(3) Dic(9)
4	Giudicarie (TN)	4e	2014: Ott(9) Sett(9) 2015: Apr(6)
4	Giudicarie (TN)	4f	2014: Ott(5)
5	Alto Brenta (TN)	H	2014: Mar(10)
5	Alto Brenta (TN)	5a	2014: Mag(9)
5	Alto Brenta (TN)	5b	2014: Mag(9)
5	Alto Brenta (TN)	5c	2014: Lug(9)
6	Giudicarie (TN)	6a	2014: Mag(4)
6	Giudicarie (TN)	6b	2014: Mag(5)
6	Giudicarie (TN)	6c	2014: Mag(5)
6	Giudicarie (TN)	6d	2014: Mag(3)
6	Giudicarie (TN)	6e	2014: Mag(6)
6	Giudicarie (TN)	6f	2014: Mag(5)
6	Giudicarie (TN)	6g	2014: Mag(4)
6	Giudicarie (TN)	6h	2014: Ago(11) Ott(24)
6	Giudicarie (TN)	6i	2014: Lug(11)
6	Giudicarie (TN)	6l	2014: Lug (4)
6	Giudicarie (TN)	6m	2014: Lug(5)
6	Giudicarie (TN)	6n	2014: Lug(5)
6	Giudicarie (TN)	6a	2014: Dic(8)
7	Giudicarie (TN)	7a	2014: Lug(3)
7	Giudicarie (TN)	7b	2014: Lug(3)
7	Giudicarie (TN)	7c	2014: Lug(2)
7	Giudicarie (TN)	7d	2014: Lug(2)
7	Giudicarie (TN)	7e	2014: Lug(3)
7	Giudicarie (TN)	7f	2014: Lug(2)
7	Giudicarie (TN)	7g	2014: Lug(3)
7	Giudicarie (TN)	7h	2014: Lug(3)
7	Giudicarie (TN)	7i	2014: Ott(7)
7	Giudicarie (TN)	7l	2014: Ott(7)
7	Giudicarie (TN)	7m	2014: Ott(5)
7	Giudicarie (TN)	7n	2014: Ott(5)
8	Giudicarie (TN)	8a	2015: Feb(4) Apr(5)
9	Giudicarie (TN)	9a	2014: Dic (18)
10	Giudicarie (TN)	10a	2015: Gen (7)
11	Alto Garda (TN)	11a	2014: Gen (7)
12	Veneto	12a	2014: Apr (5)
13	Umbria	13a	2015: Apr (5)

2.3 RISULTATI

2.3.1 RISULTATI DELLA PRIMA FASE DI MONITORAGGIO

2.3.1.1 Esito dell'Esame Anamnestico

Da quanto riferito dagli allevatori la comparsa dei primi episodi di malattia branchiale risalivano al 2012 in tutti e cinque gli allevamenti.

Nell'allevamento 1 la mortalità è iniziata repentinamente a fine dicembre nella vasca A e a gennaio nella vasca B, perdurando per tutto l'inverno e regredendo progressivamente in entrambe le vasche tra marzo ed aprile. Le perdite sono state del 60% nella vasca A e del 30% nella vasca B.

La mortalità nell'allevamento 2 si è manifestata nelle vasche C e D in dicembre, con un andamento simile alla prima trocicoltura ma con perdite più contenute rispetto agli episodi degli anni precedenti (inferiori al 10%).

La vasca E dell'allevamento 3 è stata interessata da un picco di mortalità a fine novembre con progressiva riduzione verso la primavera, complessivamente le perdite hanno raggiunto il 70%.

Nell'allevamento 4, nelle vasche F e G, la malattia branchiale è comparsa più tardi rispetto alle altre trocicolture (febbraio) con perdite del 50% per poi ridursi in primavera.

Nell'allevamento 5, in alcune vasche, sono stati segnalati episodi di mortalità che arrivavano al 26% a fine agosto 2013, riconducibili a malattia branchiale, terminati in autunno. A marzo si manifestava sintomatologia respiratoria nella vasca E, senza episodi di mortalità. La durata e l'intensità degli episodi di mortalità sono rappresentati in tabella 4.

Tabella 4: Durata ed intensità della mortalità di trote nell'anno 2013-2014 nelle vasche oggetto di indagine dei cinque allevamenti monitorati. In arancione periodo monitoraggio della vasca H senza mortalità.

Allev.	Vasca	Lug.	Ago.	Set.	Ott.	Nov.	Dic.	Gen.	Feb.	Mar.	Apr.	Mag.	Mortalità
1	A						X	X	X	X	X		60%
1	B							X	X	X	X		30%
2	C						X	X	X	X	X		<10%
2	D						X	X	X	X	X		<10%
3	E					X	X	X	X	X	X		70%
4	F								X	X			50%
4	G								X	X	X		50%
5	H									//			0%

La mortalità si è verificata in tutte le vasche degli allevamenti dopo l'immissione degli esemplari giovani nelle vasche da ingrasso.

Negli allevamenti 3 e 4 sono stati segnalati anche episodi di malattia branchiale in pesci di taglia medio-grande con livelli di mortalità più contenuti rispetto ai giovani, ove non sono state effettuate analisi.

Recidive della patologia branchiale e mortalità correlabile non sono mai state segnalate, successivamente all'episodio di malattia, nelle vasche oggetto di campionamento.

Le vasche monitorate ricevevano tutte acque provenienti da fiumi e torrenti limitrofi tranne la vasca H dell'allevamento 5 dove si utilizzavano acque di sorgente.

Durante i mesi primaverili negli allevamenti 1, 3 e 5 è stata osservata torbidità dell'acqua nelle vasche dovuta a presenza di solidi sospesi e di materiale organico sul fondo. Il fenomeno è da mettere in correlazione con eccessiva somministrazione di mangime ed allo scioglimento delle nevi (stagione delle torbide). Tale situazione si manifestava nel periodo in cui la mortalità era in fase di regressione.

Nell'allevamento 4 sono state segnalate elevate mortalità da ictioftiriasi (*Ichthyophthirius multifiliis*) nei mesi precedenti allo studio. Nell'allevamento 5, era presente un quadro di enterite diffuso a settembre, prima degli episodi di mortalità da malattia branchiale. Nelle altre tre trocolture non sono state segnalate patologie concomitanti.

2.3.1.2 Esito dell'Esame Clinico

All'esame clinico, le trote nuotavano lentamente in superficie ed erano addensate nella parte iniziale delle vasche, dove l'acqua è più ricca di ossigeno. Nelle vasche degli allevamenti 1, 2, 3 e 4 i pesci colpiti presentavano opercoli divaricati lasciando intravedere branchie anemiche, sporgenti e rigonfie (figura 40). Trote con ipermelanosi cutanea si rinvenivano in prossimità delle sponde (figura 41). Al fondo vasca ed addossati alle griglie di scarico erano presenti numerosi esemplari morti o moribondi (figura 42).



Figura 40: Trote addensate sulla sponda della vasca.



Figura 41: Trota morta con opercoli divaricati.



Figura 42: Trote morte addossate in griglia nella vasca A dell'allevamento 1.

I pesci alla morte non presentavano dimagrimento ed erano in buone condizioni con alimento nel tubo gastroenterico. La sintomatologia respiratoria e i fenomeni di mortalità sono regrediti durante i mesi primaverili. Nelle vasche C e D dell'allevamento 2 era presente sintomatologia con bassa mortalità, nella vasca H della trotilcoltura 5 non si registravano mortalità.

2.3.1.3 Risultati delle analisi delle acque

2.3.1.3.1 Ossigeno

Il valore ottimale di ossigeno in vasca è di 9-10,5 mg/L mentre il livello soglia sotto il quale l'accrescimento è penalizzato è di 5 mg/L (Borroni, 2007). Negli allevamenti indagati i valori di O₂ erano vicini o superavano il valore ottimale come indicato nella figura 43.

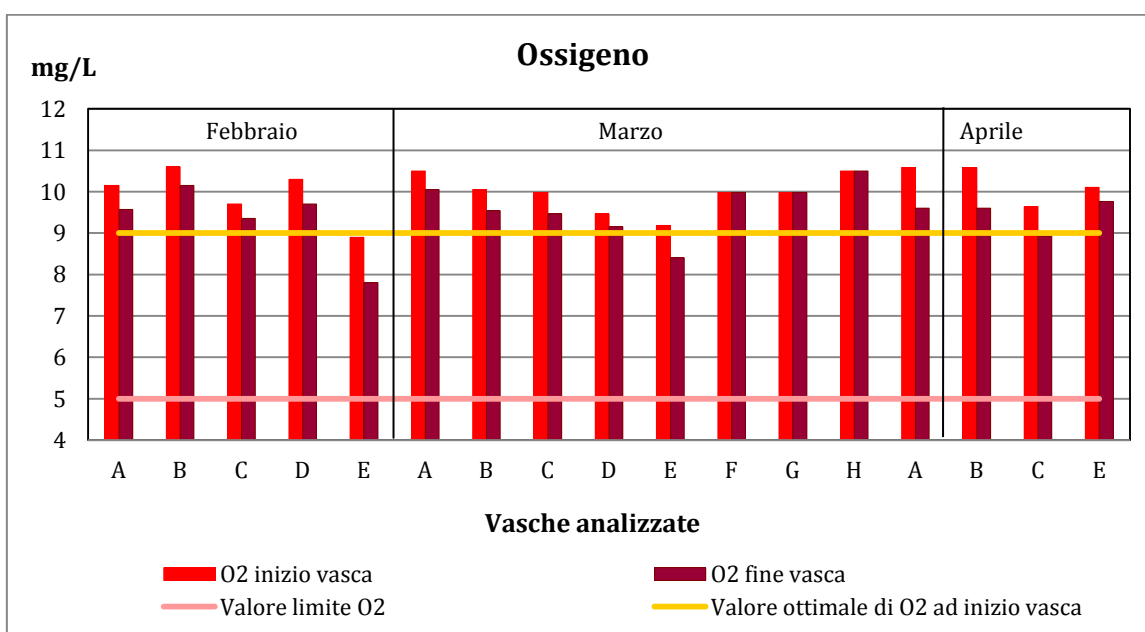


Figura 43: Andamento dei livelli di ossigeno nelle vasche indagate durante il periodo di indagine.

2.3.1.3.2 Temperatura

La temperatura misurata in ogni vasca è rappresentata nella figura 44.

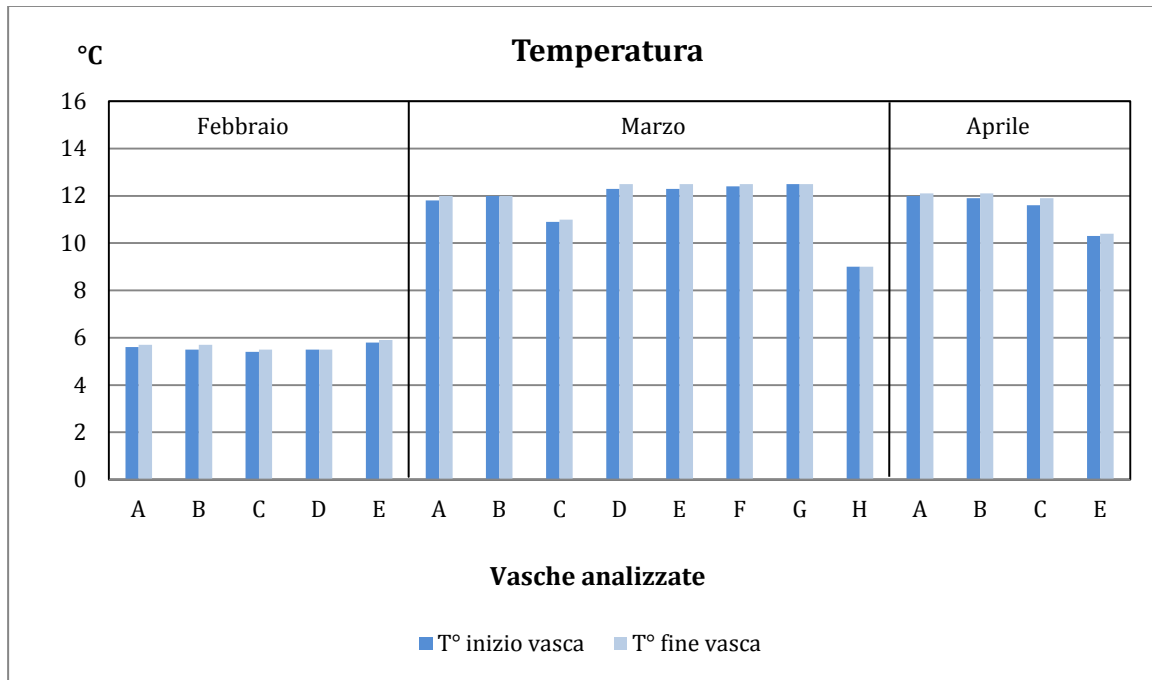


Figura 44: Temperature misurate nelle vasche durante il monitoraggio.

2.3.1.3.3 pH

Il valori di pH compatibili con l'allevamento della trota devono essere compresi tra 6,5 e 8,5. In tutte le vasche analizzate sono stati rilevati livelli di pH nella norma con valori che variavano da 7 a 7.5 (figura 45).

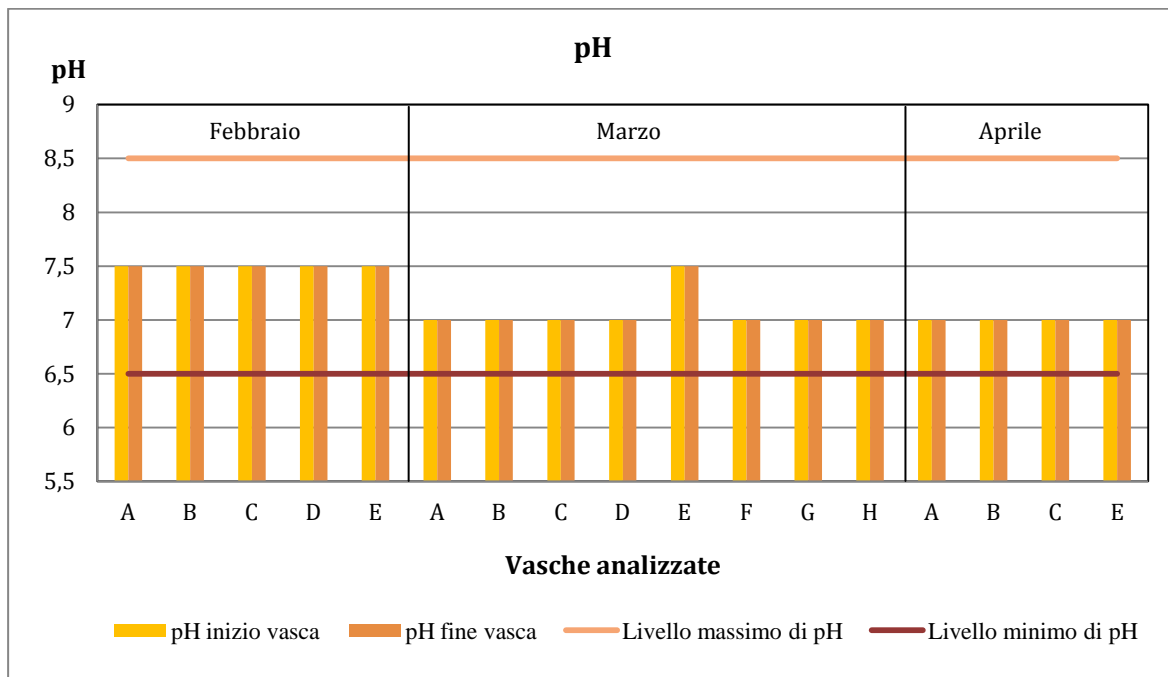


Figura 45: Valore del pH delle vasche durante il monitoraggio.

2.3.1.3.4 Ammoniaca

Il valore limite di ammoniaca indissociata è di 0,005 mg/L nel novellame mentre sale a 0,0125 mg/L nelle taglie maggiori (Borroni, 2007). Negli allevamenti oggetto di studio non sono mai stati rilevati valori di ammoniaca indissociata che superassero il livello soglia (figura 46).

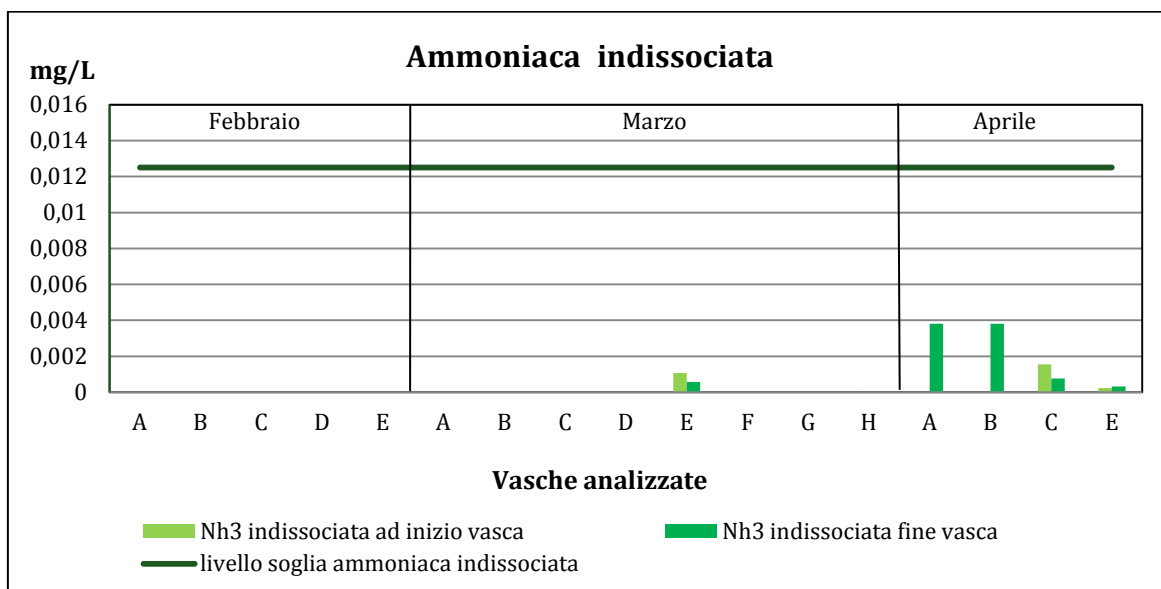


Figura 46: Livelli di ammoniaca indissociata ad inizio e fine vasca durante il periodo di indagine.

2.3.1.3.5 Nitriti

Il valore massimo di nitriti, tollerato dalla trota iridea, dovrebbe essere inferiore a 0,1 mg/L (Borroni, 2007). Dalle analisi è risultato che i livelli di nitriti nella norma in tutte le vasche (Figura 47).

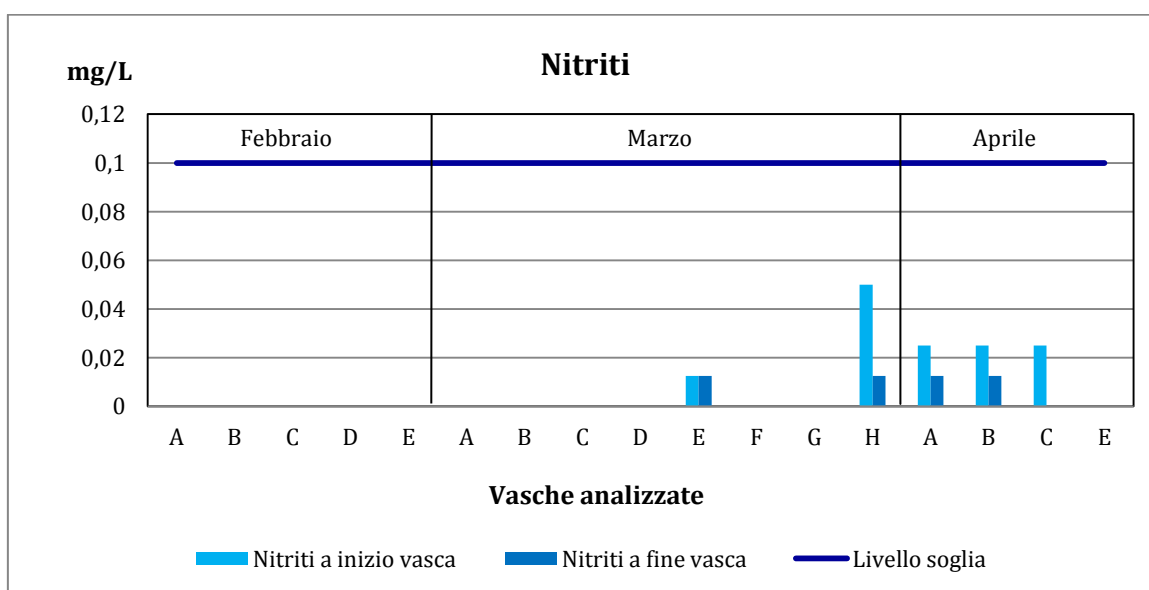


Figura 47: Livelli di nitriti ad inizio e fine vasca durante il periodo di indagine.

2.3.1.4 Esiti dell'Esame Necroscopico

I soggetti con sintomatologia clinica all'esame necroscopico mostravano branchie rigonfie caratterizzate da un aspetto proliferativo con ipermucosità, presenza di noduli biancastri di 1-2 mm di diametro maggiormente presenti nelle porzioni distali dei filamenti, alternanza di aree anemiche e congeste e striature emorragiche. I noduli coinvolgevano diversi filamenti adiacenti e protrudevano verso filamenti contigui non affetti. Le lesioni potevano riguardare l'intero arco branchiale o avere carattere focale. Tra i filamenti sulla superficie branchiale era possibile osservare residui alimentari e detriti di varia origine frammisti a muco (figura 43).



Figura 48: Trota con branchie anemiche e detriti.

Basandosi sul metodo di valutazione macroscopica di Taylor et al. (2009) per le lesioni da AGD nel salmone atlantico sono stati osservati sei gradi di gravità delle lesioni branchiali.

- **Grado 0:** Assenza di lesione, branchia sana di colore rosso chiaro (figura 49).
- **Grado 1:** Lesione singola biancastra con aspetto rigonfio, presenti rare striature necrotiche (figura 50).
- **Grado 2:** Presenti due o tre aree biancastre con lesioni rigonfie ed ipermucosità (figura 51).
- **Grado 3:** Lesioni con ipermucosità interessano fino al 20% dell'arco branchiale coinvolgendo più gruppi di filamenti (figura 52).
- **Grado 4:** Le lesioni interessano oltre in 50% del tessuto branchiale, vaste aree di ipermucosità interessano ampi gruppi di filamenti (figura 53).
- **Grado 5:** Le lesioni interessano la totalità, o quasi, della branchia, scomparsa della struttura filamentosa (figura 54)



Figura 49: Grado 0, nessuna lesione.



Figura 50: Grado 1, lesione isolate.



Figura 51: Grado 2, lesioni lievi.



Figura 52: Grado 3, lesioni moderate.



Figura 53: Grado 4, lesioni avanzate.



Figura 54: Grado 5, lesioni gravi.

Tale classificazione è stata ripresa ed approfondita durante l'esame istologico. Non sono state osservate particolari differenze macroscopiche tra l'arco branchiale più esterno e quelli sottostanti.

L'esame della cute e del tessuto muscolare non ha rilevato particolari alterazioni. All'apertura della cavità addominale non sono state osservate lesioni correlabili alla malattia branchiale. Il fegato, in oltre la metà dei campioni, si presentava con una colorazione scura tendente al bruno (figura 55), indice di ipossia e o ipercapnia. Occasionalmente sono state osservate splenomegalie, enteriti, e steatosi.

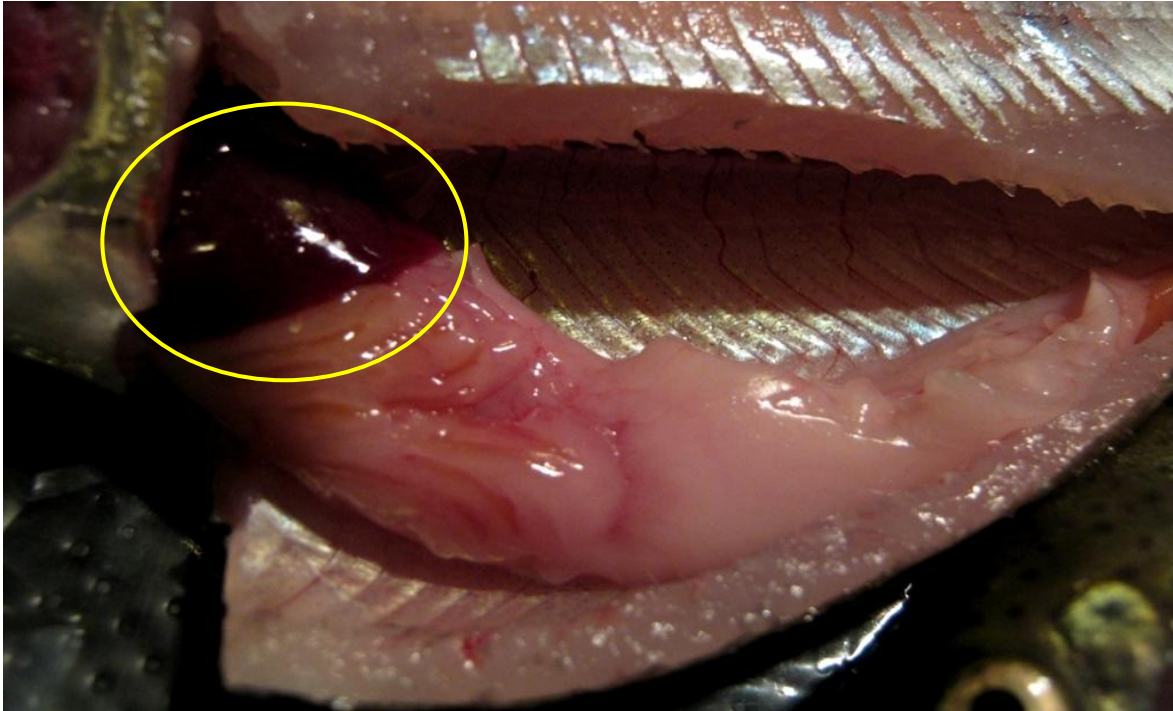


Figura 55: Esame necroscopico, lieve congestione epatica.

2.3.1.5 Esiti dell'Esame Microscopico a fresco

L'esame al microscopio a fresco ha rilevato un'intensa reazione iperplastica associata ad aumento della produzione di muco nel 77,4% delle branchie oggetto dell'indagine. I filamenti colpiti perdevano la normale struttura arboriforme per assumere un profilo arrotondato e dilatato, specialmente a livello apicale (figura 56), definito in gergo aspetto a cerino. Nei segmenti di tessuto interessati le lamelle collabivano tra loro, così da apparire una massa unica. In alcuni casi la struttura delle lamelle non era riconoscibile se non per la presenza di sangue all'interno dei capillari.

Nei casi di maggiore gravità i filamenti potevano fondersi tra loro a gruppi di due o più, fino a coinvolgere tutto l'arco branchiale (figura 57). Sono stati osservati con frequenza anche deviazioni ed incurvamenti degli apici dei filamenti (figura 58).

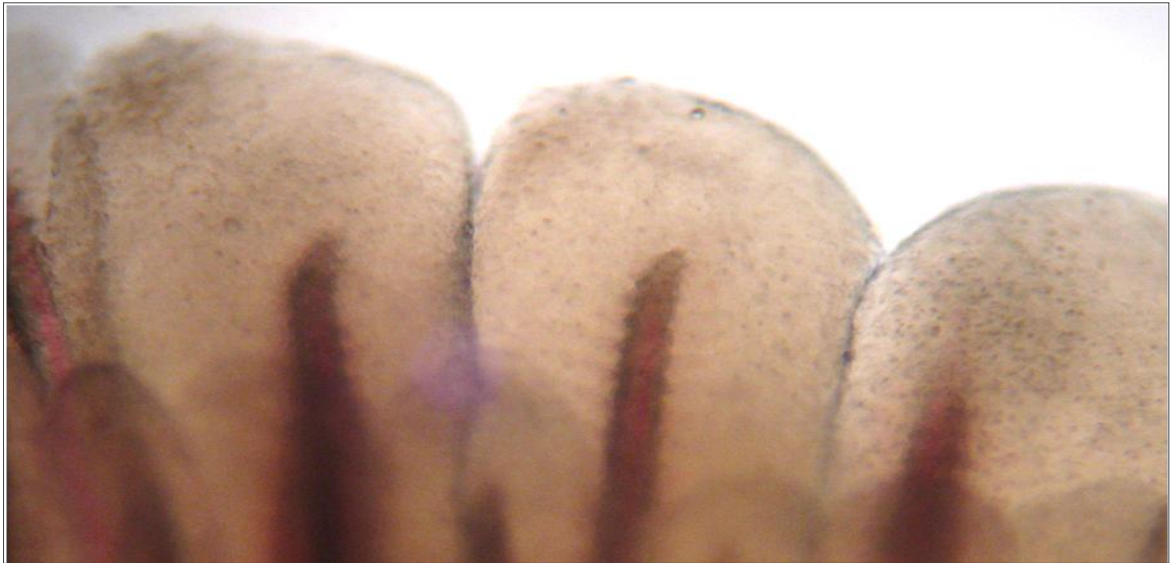


Figura 56: Filamenti con apice arrotondato per intensa reazione iperplastica.

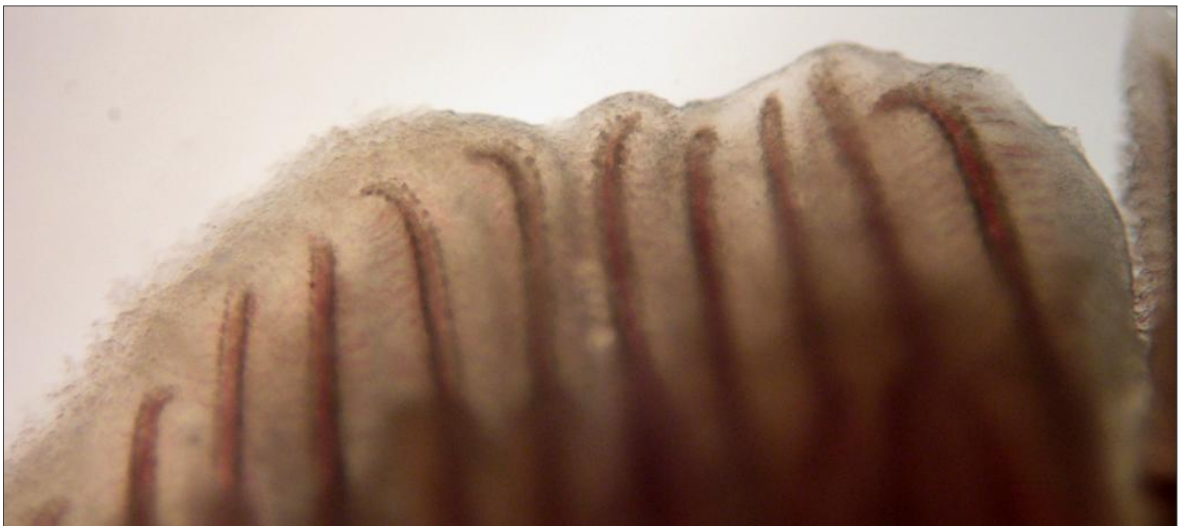


Figura 57: Severa proliferazione con fusione di 11 filamenti branchiali.

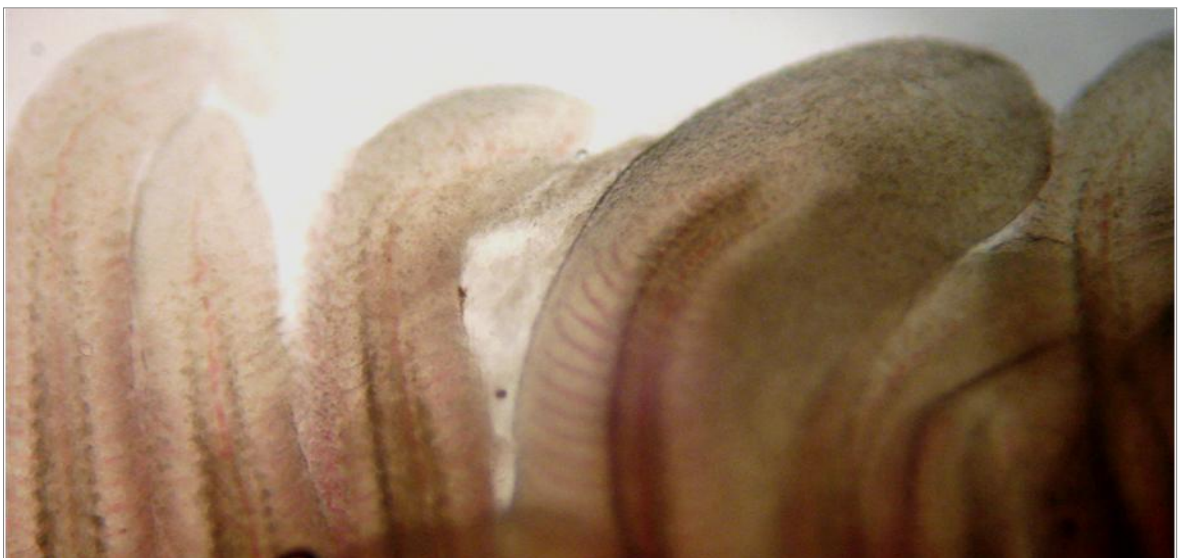


Figura 58: Apici filamentosi incurvati associati ad iperplasia.

La maggior parte delle branchie era anemica associata ad emorragie. Sono state osservate frequentemente congestioni vascolari e teleangectasie (figura 59).

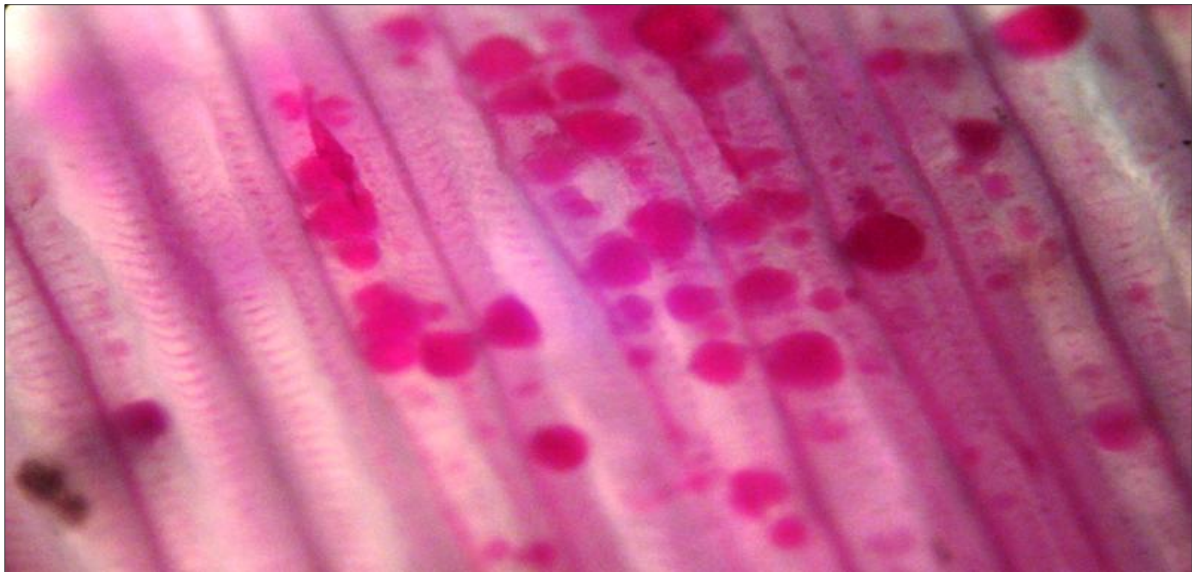


Figura 59: Teleangectasie a livello lamellare.

Un abbondante strato di muco avvolgeva i filamenti iperplastici, talvolta con detriti, residui di mangime ed alghe, trattenute dove l'acqua era ricca di materiale organico (Figura 60).

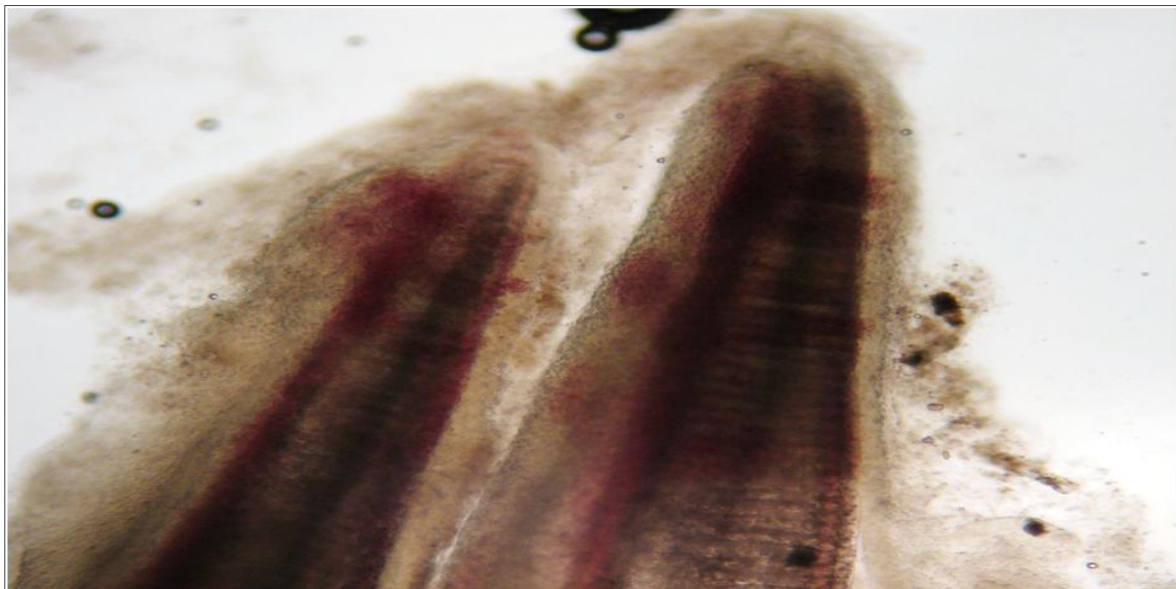


Figura 60: Filamenti circondati da un abbondante strato di muco e detriti.

Le alterazioni anatomopatologiche delle branchie erano più gravi nelle trote prelevate sulla griglia di uscita dell'acqua rispetto a quelle di inizio vasca. Sono state osservate lesioni a livello branchiale in tutte le vasche monitorate eccetto nella vasca H dell'allevamento 5 dove le branchie non mostravano particolari alterazioni.

2.3.1.6 Esiti Esame Batteriologico

All'esame batteriologico sei campioni di tessuto branchiale sono risultati positivi al genere *Flavobacterium*.

Le analisi molecolari hanno permesso di identificare il genere *Flavobacterium* ma non hanno rilevato presenza di *F. psychrophilum* tra i campioni analizzati.

Le branchie positive, appartenenti a trote di due allevamenti (1 e 2), sono state prelevate tutte nel mese di febbraio tranne una a marzo proveniente dalla vasca D della trotilcoltura 2, come indicato in tabella 5.

Tabella 5: Numero dei campioni positivi all'esame batteriologico per *Flavobacterium* con vasche di provenienza e periodo del prelievo.

Numero di campioni positivi a <i>Flavobacterium</i> sp.	Allevamento e Vasca di provenienza	Periodo del prelievo
1	1 - B	Febbraio 2014
2	2 - C	Febbraio 2014
1	2 - D	Febbraio 2014
1	1 - A	Febbraio 2014
1	2 - D	Marzo 2014

I campioni di branchie positive all'esame batteriologico, osservati all'esame istologico, non hanno evidenziato una diretta relazione con il grado delle lesioni, che sono state rilevate per lo più in assenza batterica, come indicato nella figura 61. La maggior parte delle branchie esaminate (il 93,9%) è risultata negativa al batteriologico indipendentemente dal grado di alterazione tissutale.

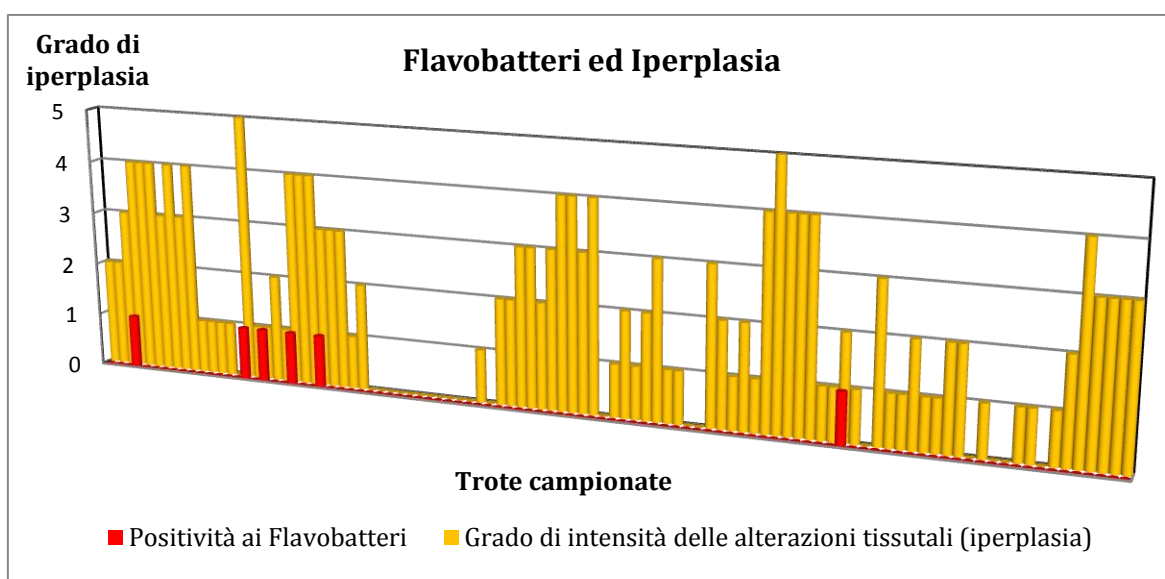


Figura 61: Confronto tra il grado di intensità delle lesioni iperplastiche osservate all'istologico in branchie positive ai flavobatteri e confronto del grado di intensità fra branchie positive e negative all'esame batteriologico.

2.3.1.7 Esiti Esame Istologico Ematossilina-Eosina

All'osservazione istologica a basso ingrandimento delle sezioni branchiali è stata rilevata intensa reazione proliferativa. L'iperplasia portava le cellule dell'epitelio ad occupare l'intero spazio interlamellare, conferendo aspetto digitiforme all'intero filamento o a parte di esso. In alcuni casi la marcata proliferazione cellulare modificava la struttura dell'apice del filamento che assumeva un aspetto rotondeggiante dilatato (figura 62).



Figura 62: Filamenti iperplastici con lamelle fuse tra loro, da notare la forma a cerino dei tre apici a destra (E-E).

Nei casi più gravi i filamenti interessati collabivano tra loro in gruppi di due o più elementi (figura 63). Le fusioni potevano riguardare le sole porzioni apicali dei filamenti o coinvolgere le strutture per tutta la loro lunghezza.

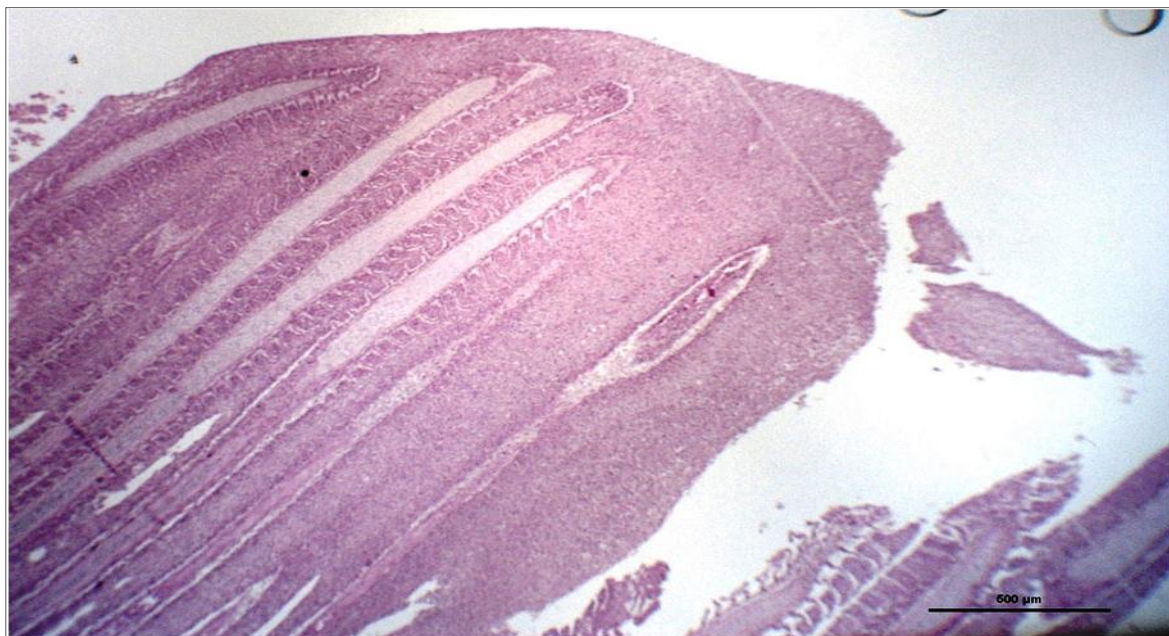


Figura 63: Intensa reazione iperplastica con fusione di otto filamenti branchiali tra loro (E-E).

La reazione proliferativa, che corrispondeva ai noduli osservati a fresco, era diffusa primariamente agli apici e, in misura minore, alle basi dei filamenti e con la progressione del fenomeno si estendeva all'intero filamento. In particolare erano maggiormente coinvolti i filamenti ai margini dell'arco branchiale mentre quelli disposti centralmente erano interessati solo nei casi più gravi.

A maggior ingrandimento una massiva iperplasia epiteliale multifocale interessava la regione distale o l'intera lunghezza di più filamenti adiacenti.

Le cellule epiteliali erano caratterizzate da pleomorfismo nucleare (anisocariosi). Alcuni nuclei si presentavano abnormemente ipertrofici con piccolo nucleolo in posizione centrale, citoplasma ridotto e pallido e contorni cellulari mal distinti o ben definibili per presenza di spongiosi. L'osservazione di figure mitotiche era comune.

Nei filamenti si osservavano numerose cellule epiteliali in necrosi con evidente picnosi, carioressi e cariolisi.

Fra le cellule dell'epitelio si rilevava infiltrato flogistico con numerosi linfociti, macrofagi e cellule granulari eosinofile/mastociti. Numerose cellule mucipare ipertrofiche erano presenti sia sulla superficie sia all'interno del tessuto iperplastico. Abbondanza di muco si osservava esternamente alle branchie. Nelle lamelle in corrispondenza dei capillari, talvolta, si notava uno scollamento dell'epitelio dalla lamina basale, riferibile ad edema (figura 64).

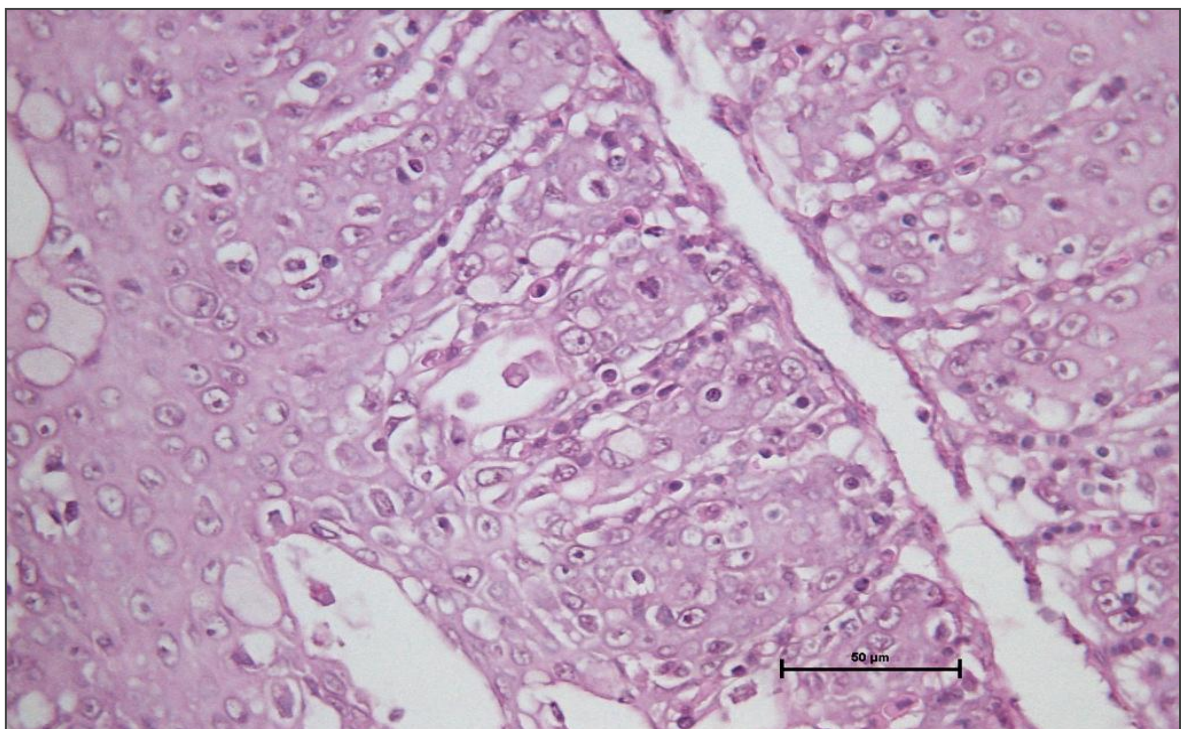


Figura 64: Edemi lamellari associati ad un quadro di iperplasia epiteliale (E-E).

In oltre la metà delle branchie colpite nelle regioni più esterne delle masse iperplastiche (apici e spazi fra filamenti adiacenti) è stato evidenziato un intenso sfaldamento tissutale con detriti cellulari distaccati (figura 60) ed altro materiale organico ed inorganico (spesso alghe) frammisto allo strato di muco.

Gli sfaldamenti potevano manifestarsi con intensità diversa indipendentemente dalla gravità del fenomeno proliferativo. Con minor frequenza sono stati osservati quadri emorragici (presenza di eritrociti negli spazi tra due filamenti), teleangectasie e congestioni a carico dei vasi delle lamelle e dei filamenti.

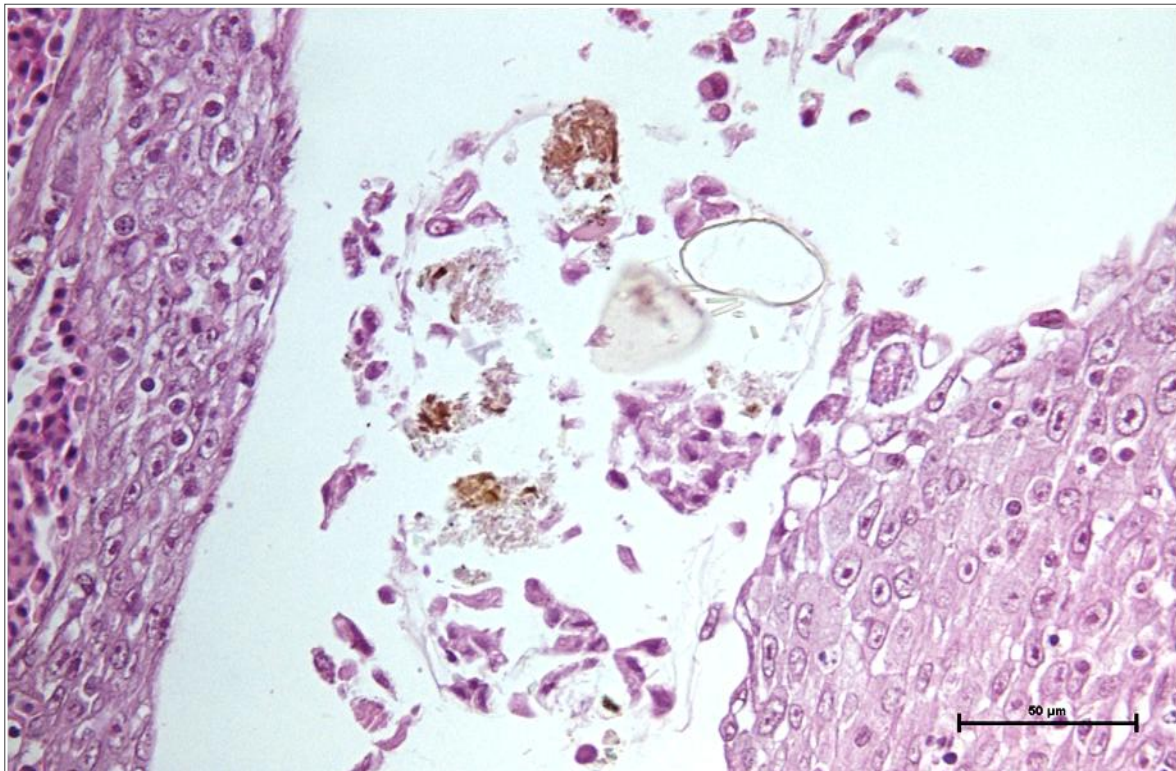


Figura 65: Sfaldamenti cellulari, muco e detriti situati tra due filamenti iperplastici (E-E).

Una modesta presenza di polimicrobismo, con batteri di morfologia variabile (cocchi, cocco-bacilli e bacilli), è stata riscontrata in più della metà della branchie esaminate, esternamente tra i detriti e le cellule in sfaldamento. In otto branchie sono stati osservati aggregati di batteri bacillo-filamentosi sia circondati da epitelio lamellare in proliferazione sia presenti all'esterno.

Associate alle lesioni sono state osservate strutture cellulari, le cui dimensioni variavano dai 15 µm ai 25 µm, di forma variabile poliedriche, rotondeggiante o allungate con citoplasma acidofilo, presenza di vacuoli e nucleo centrale lievemente basofilo di diametro compreso tra i 3 µm e i 4 µm, con cromatina condensata alla periferia, circondato da un sottile alone chiaro. Tali cellule erano confinate alla superficie del tessuto iperplastico, o in

sfaldamento o incistate singolarmente o in piccoli gruppi, talvolta degenerate, in cavità interlamellari. L'aspetto morfologico delle cellule poliedriche è riconducibile a trofozoiti di amebe (figura 66 e 67). Il quadro proliferativo-iperplastico osservato presenta analogie con la malattia branchiale da amebe dei salmoni "Amoebic gill disease" e la malattia nodulare delle trote "Nodular gill disease" (capitolo 2.3 Discussione).

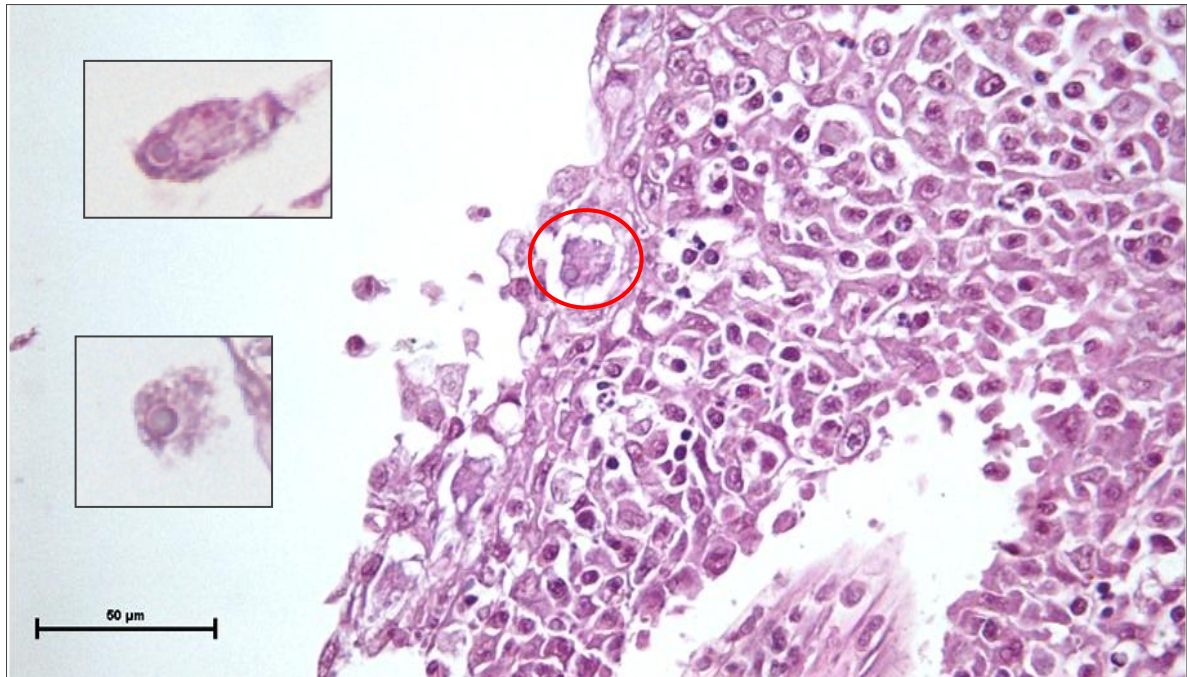


Figura 66: Sospetta ameba incistata lungo la superficie del filamento iperplastico, in dettaglio la morfologia di cellule ameba-like (E-E).



Figura 67: Sospetta ameba adesa esternamente al filamento branchiale iperplastico (E-E).

A seguito dell'osservazione di microrganismi ameba "like" è stato eseguito un esame parassitologico in coltura per amebe e sono state effettuate ulteriori colorazioni istochimiche: Giemsa, Feulgen, Ziehl-Neelsen, PAS e Tricromica di Masson.

2.3.1.8 Esito dell'Esame Parassitologico

Nelle branchie di alcuni soggetti l'esame microscopico a fresco ha evidenziato la massiva presenza di elementi rotondeggianti riferibili ad amebe di dimensioni intorno a 20 μm .

Dopo 24-48 ore dalla semina in terreno di coltura dei frammenti di branchie, sono state osservate numerose amebe spesso in replicazione (figura 68). Tali cellule presentavano morfologia riferibile a quanto descritto all'esame istologico (figura 69), erano infatti visibili numerosi granuli e vacuoli all'interno del citoplasma, mentre il nucleo era circondato da un anello caratteristico.

E' stata osservata una limitata attività motoria da parte di questi microrganismi.

Il clonaggio delle amebe non ha avuto esito positivo, come frequentemente riportato in letteratura, e non ha permesso di proseguire nell'identificazione di specie.

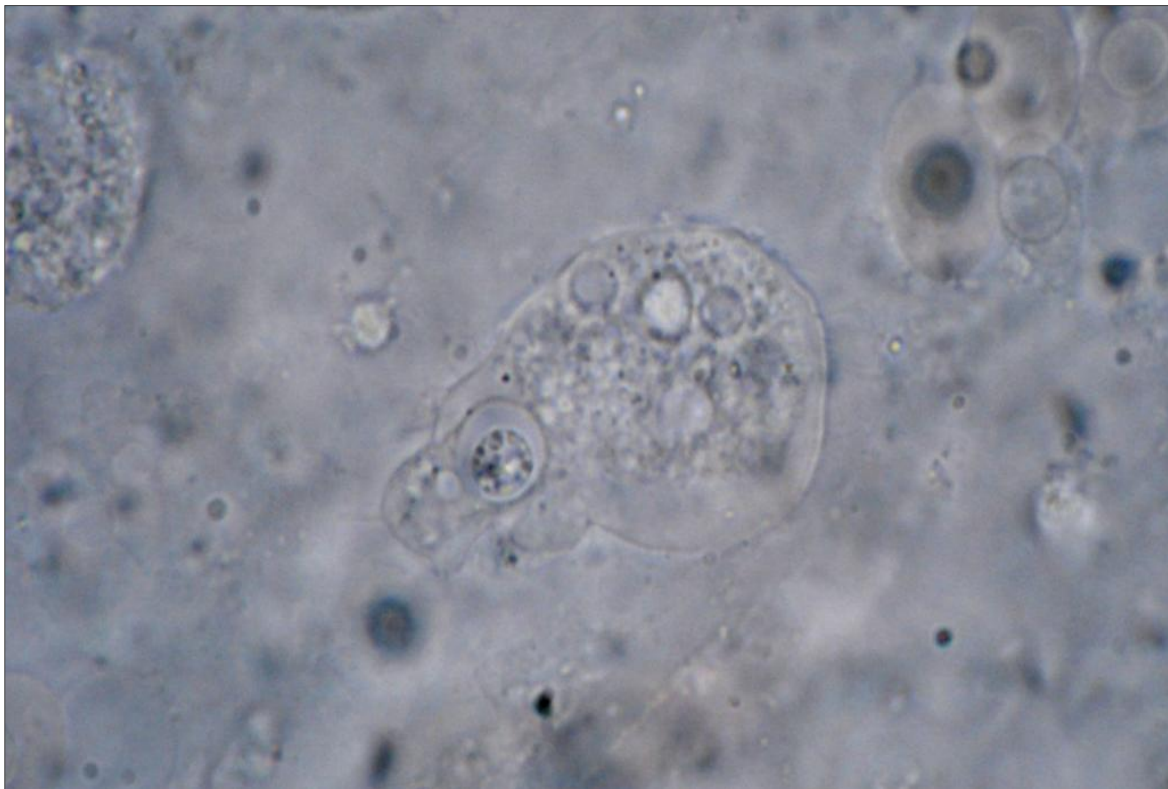


Figura 68: Ameba osservata al microscopio a fresco, da notare la presenza di granuli e vacuoli all'interno del citoplasma.

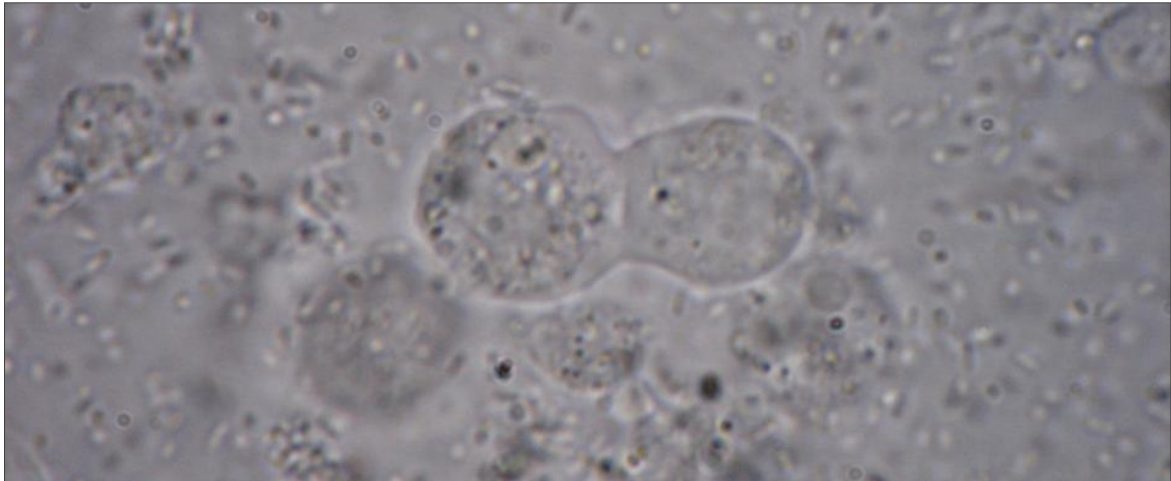


Figura 69: Amebe in replicazione.

2.3.1.9 Esiti Esame Istologico con colorazione di Giemsa

I parassiti venivano maggiormente evidenziati con il metodo di colorazione di Giemsa e si coloravano di un blu più intenso rispetto ai tessuti circostanti (forte reazione coi prodotti di ossidazione del Blu di Metilene). Tale metodo è risultato il più idoneo per l'individuazione istologica del parassita.

Le amebe osservate presentavano: una sottile cuticola ectoplasmatica, un nucleo basofilo situato al centro della cellula circondato da un anello acromatico, e un citoplasma con numerose vacuolizzazioni associate a granuli basofili aventi reazione acida che si colorano con il blu di Metilene e, in minor numero, a granuli eosinofili (figura 70 e 71).

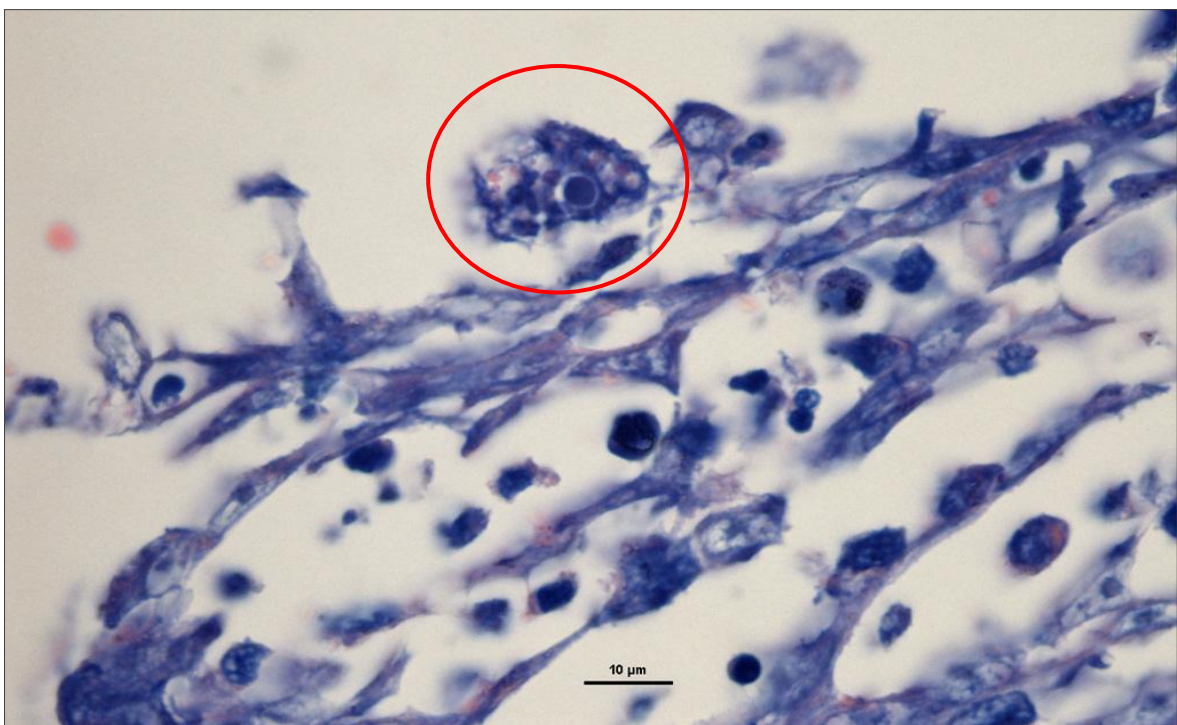


Figura 70: Ameba lungo la superficie iperplastica e in sfaldamento di un filamento (Giemsa).

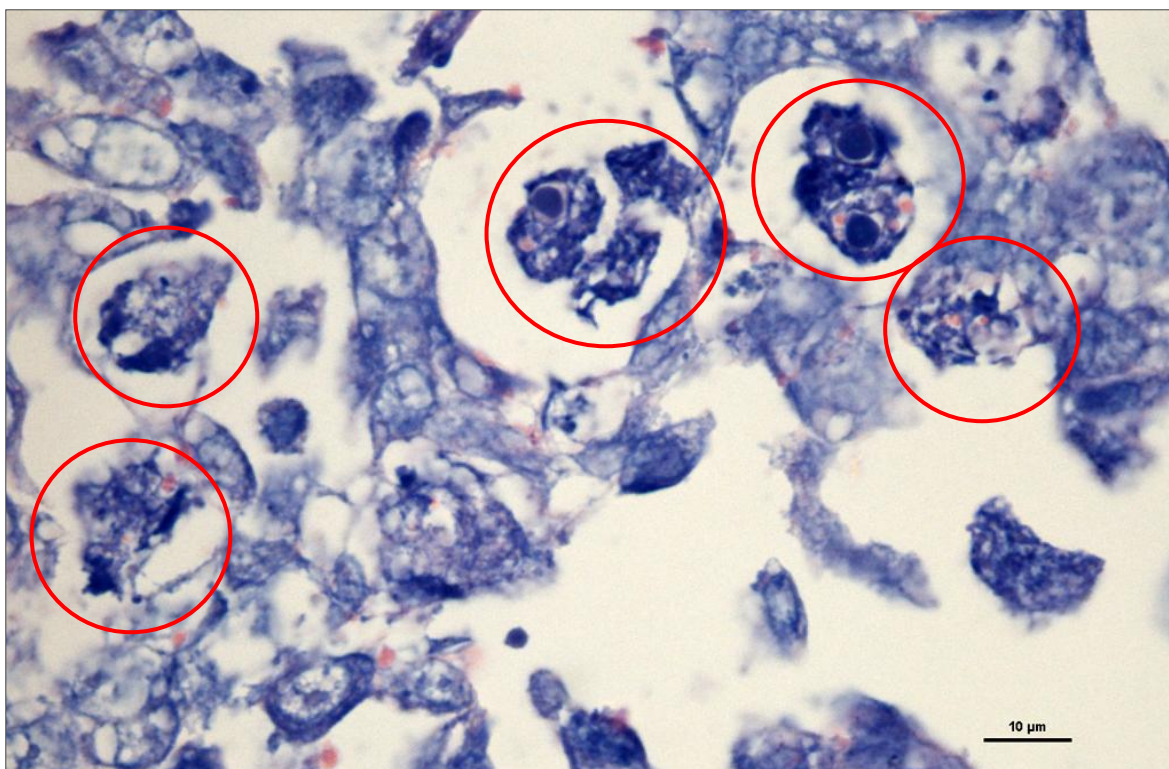


Figura 71: Amebe incistate all'interno di un filamento iperplastico (*Giemsa*).

Come osservato con questa colorazione da Buchmann et al. (2004) in sezioni di branchie di trote iridee allevate in stagno in Danimarca, durante massive infestazioni la superficie epiteliale era colonizzata da amebe disposte in sequenze continue (figura 72). Con l'aumentare del numero di microorganismi si osservavano cluster di parassiti occupare l'intero spazio tra filamenti adiacenti (figura 73).

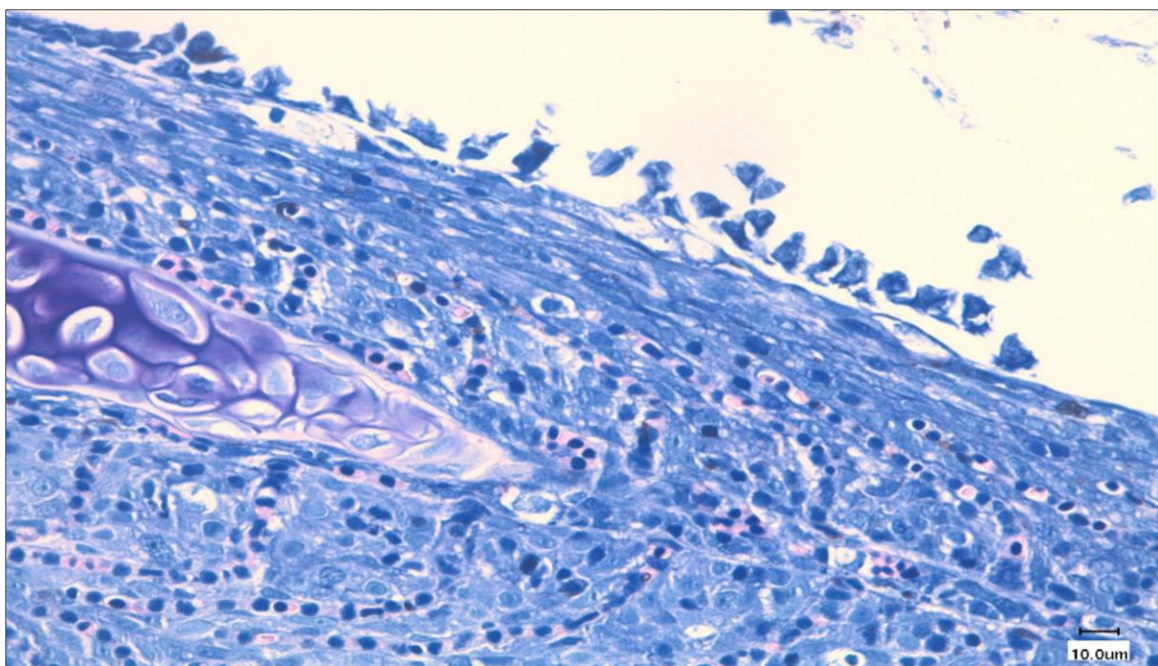


Figura 72: Amebe disposte in sequenza lungo il filamento iperplastico (*Giemsa*).

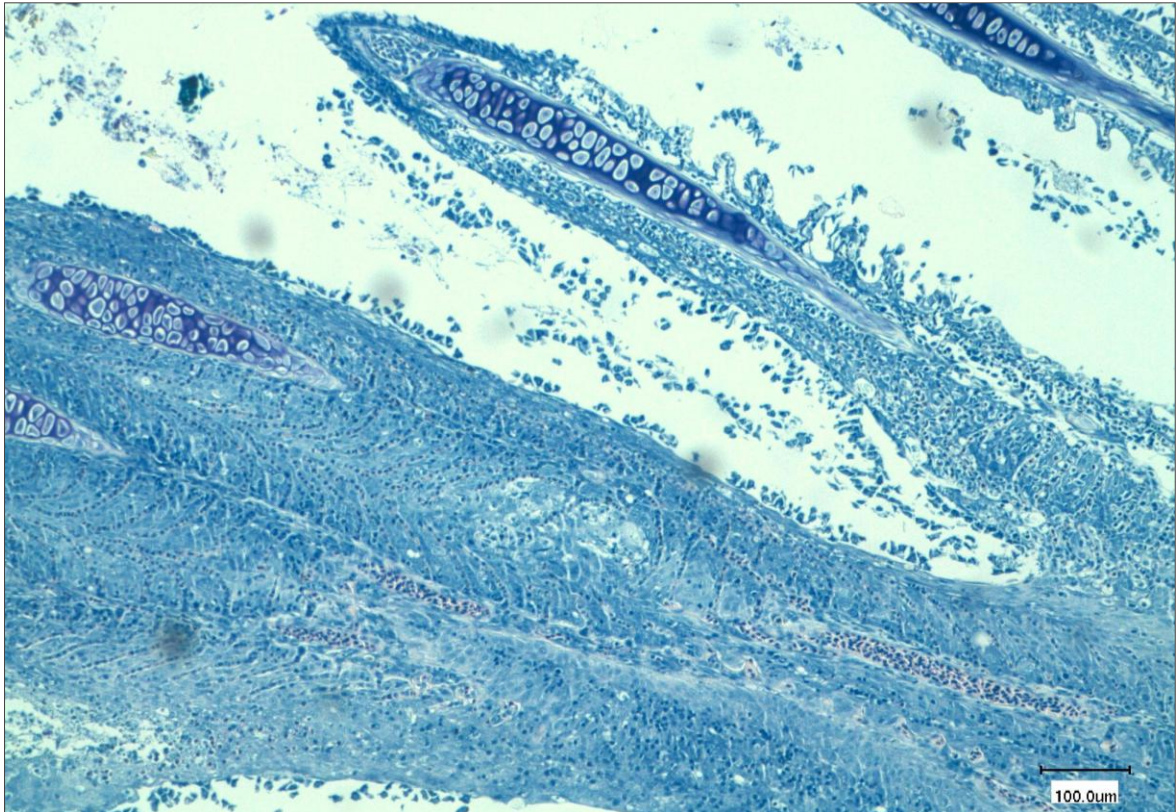


Figura 73: “Cluster” di amebe lungo la superficie dei filamenti iperplastici (Giemsa).

Sono state individuate anche amebe incistate nello strato epiteliale più superficiale del filamento, di norma si trattava di cellule isolate o di piccoli gruppi che raramente superavano le dieci unità. Il riconoscimento del parassita era agevolato dal netto contrasto, dovuto alla colorazione, tra l’ameba e il tessuto iperplastico circostante (figura 74).

Seppure raramente, sono state riscontrate amebe in presenza di un elevato numero di batteri, osservati anche nel citoplasma del parassita (segno di probabile fagocitosi).

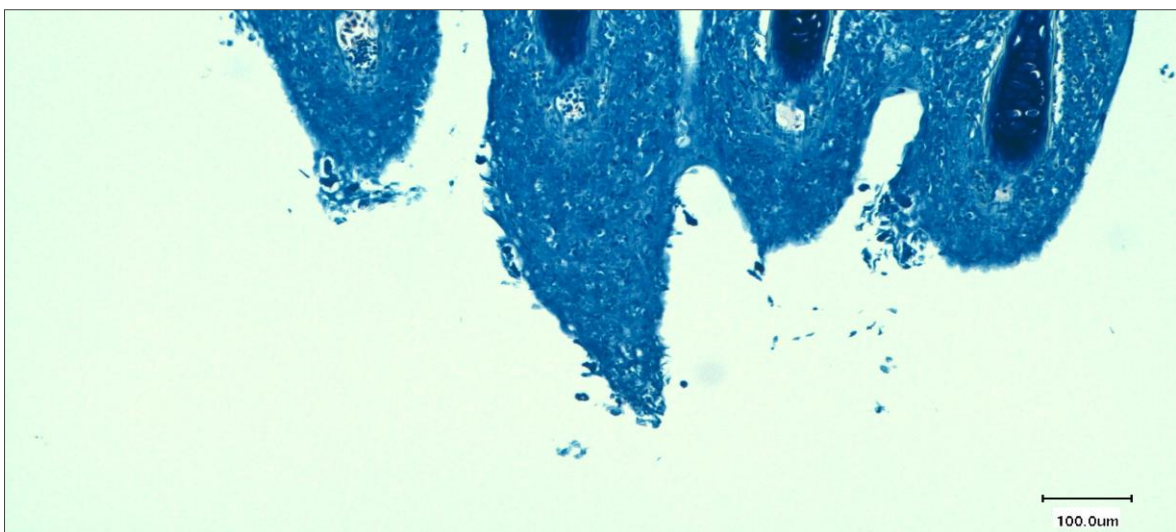


Figura 74: Sfaldamenti apicali dei filamenti iperplastici con amebe associate.

2.3.1.9.1 Gradazione delle lesioni iperplastiche

Le lesioni tissutali osservate con la colorazione di Giemsa erano sovrapponibili a quelle descritte con Ematossilina-Eosina. Prendendo spunto dal metodo di valutazione delle lesioni branchiali di Clark & Nowak (1999), applicato alla malattia branchiale da Ameba del salmone atlantico (*Salmo salar*), è stato attribuito un punteggio da 0 a 5 ad ogni branchia in base all'intensità della reazione proliferativa.

- **Grado 0:** assenza di lesioni proliferative, filamenti e lamelle presentano normale aspetto fisiologico (figura 75 e 76). Sono assenti sfaldamenti cellulari, iperproduzioni di muco, quadri necrotici od altre anomalie tissutali.

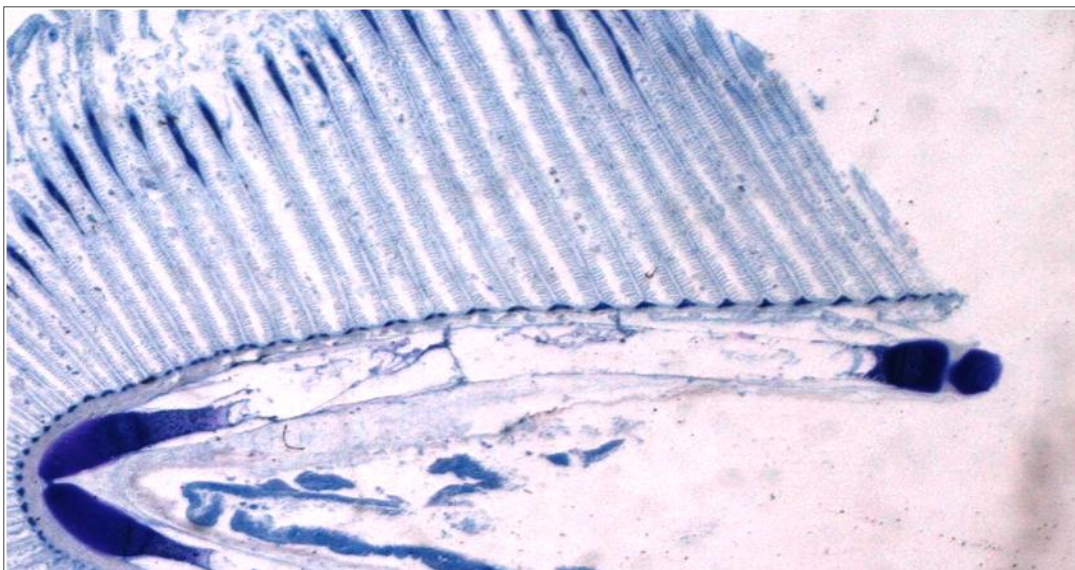


Figura 75: Grado 0, arco branchiale integro (Giemsa).

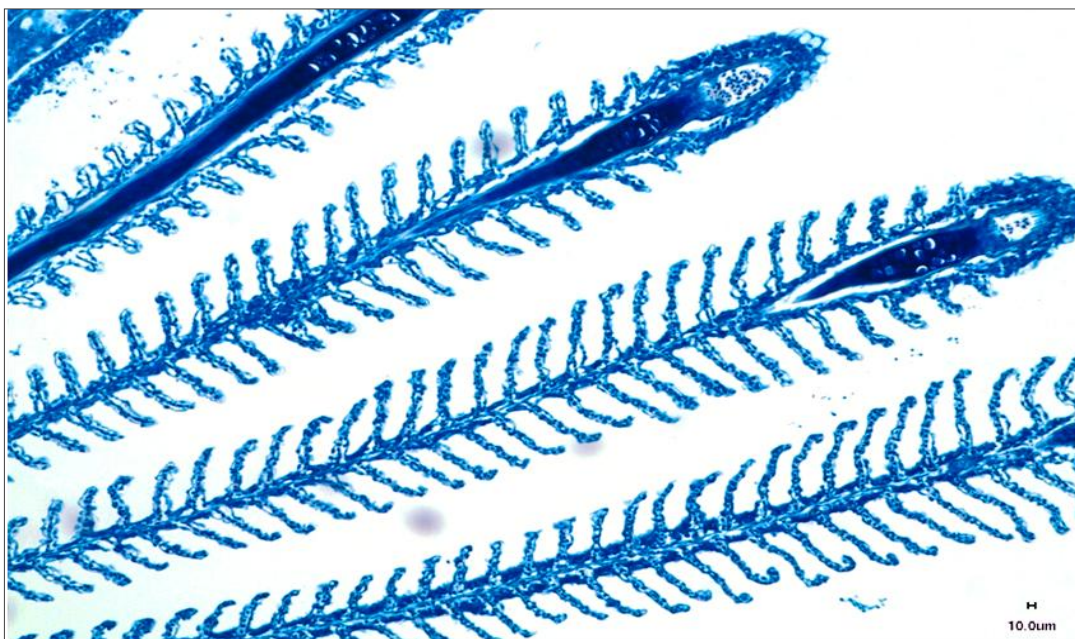


Figura 76: Grado 0, filamenti e lamelle branchiali con caratteristica struttura arboriforme (Giemsa).

- **Grado 1:** presenza di lieve iperplasia epiteliale limitata distalmente agli apici. La maggior parte dei filamenti delle lamelle sono ben definiti e separati fra loro (figura 77).



Figura 77: Grado 1, presenza di lieve iperplasia limitata agli apici dei filamenti (*Giemsa*).

- **Grado 2:** più della metà dei filamenti è interessata per un terzo della lunghezza da proliferazione cellulare. La fusione delle lamelle provoca una parziale alterazione di forma dei filamenti che assumono, nei tratti colpiti, un aspetto cilindrico. Possono essere presenti modeste quantità di cellule in sfaldamento (figura 78).

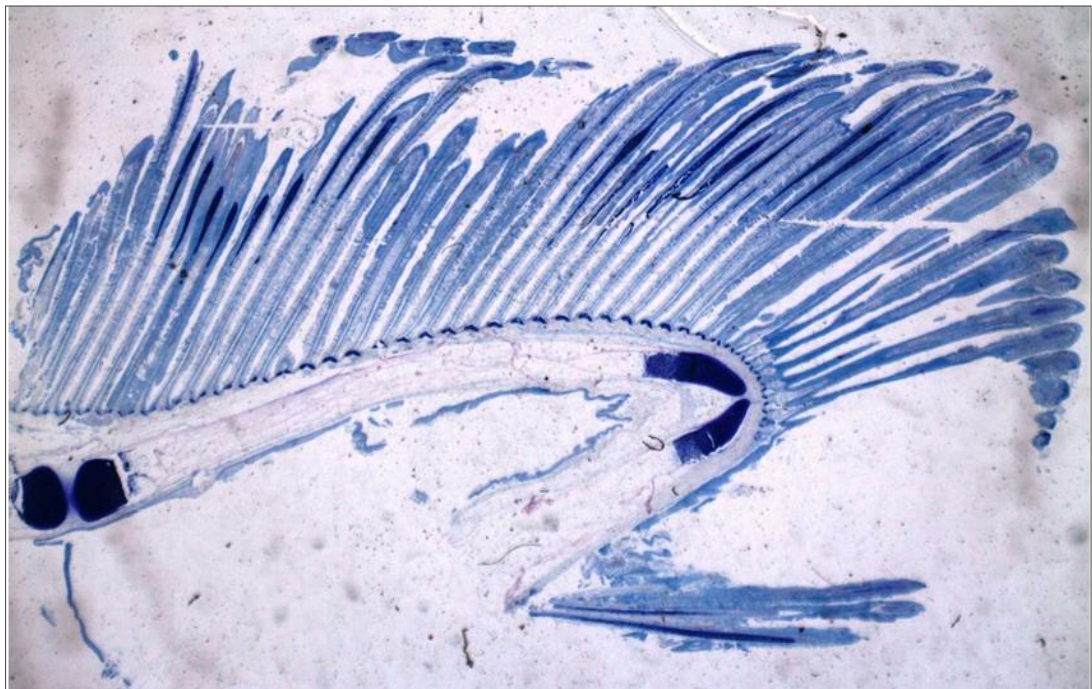


Figura 78: Grado 2, il fenomeno proliferativo coinvolge parzialmente la metà dei filamenti (*Giemsa*).

- **Grado 3:** La reazione iperplastica coinvolge fino alla metà del filamento branchiale (figura 79). A questo grado appartengono: archi branchiali interessati diffusamente da proliferazioni modeste, archi con un ridotto numero di filamenti intensamente iperplastici con gravi proliferazioni apicali e fusioni di due filamenti tra loro (principalmente a livello apicale).

Nei segmenti di tessuto colpito è presente: edema lamellare, sfaldamento cellulare (figura 80), con necrosi epiteliale, lieve iperplasia delle cellule mucipare.

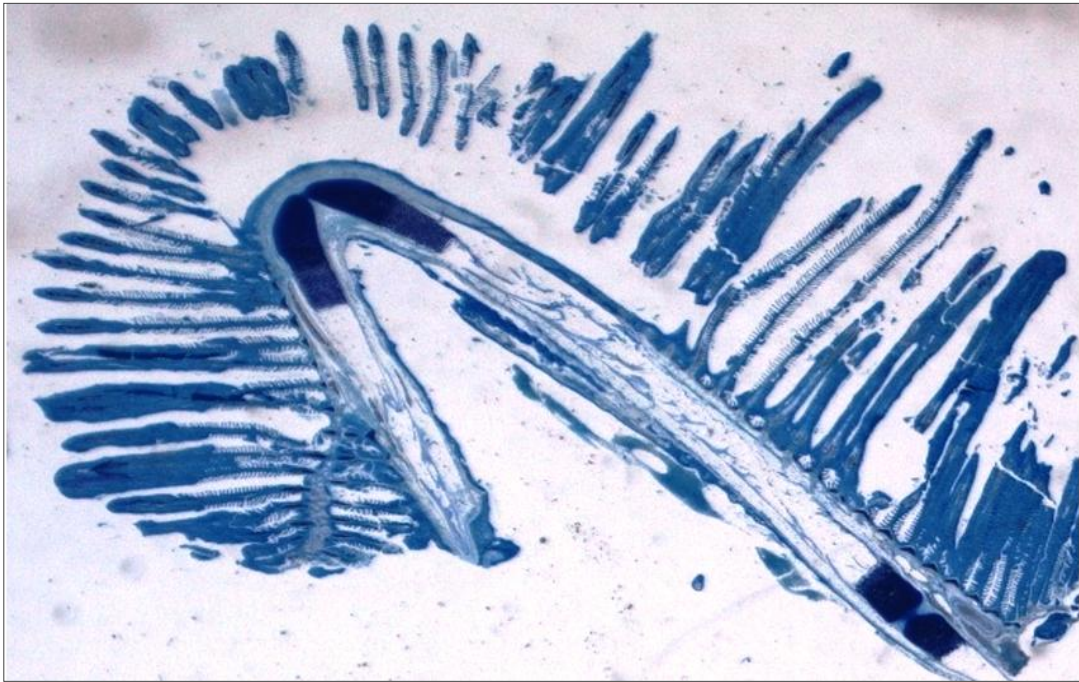


Figura 79: Grado 3, iperplasia diffusa al 50% delle lamelle, sono presenti fusioni tra filamenti adiacenti (Giemsa).

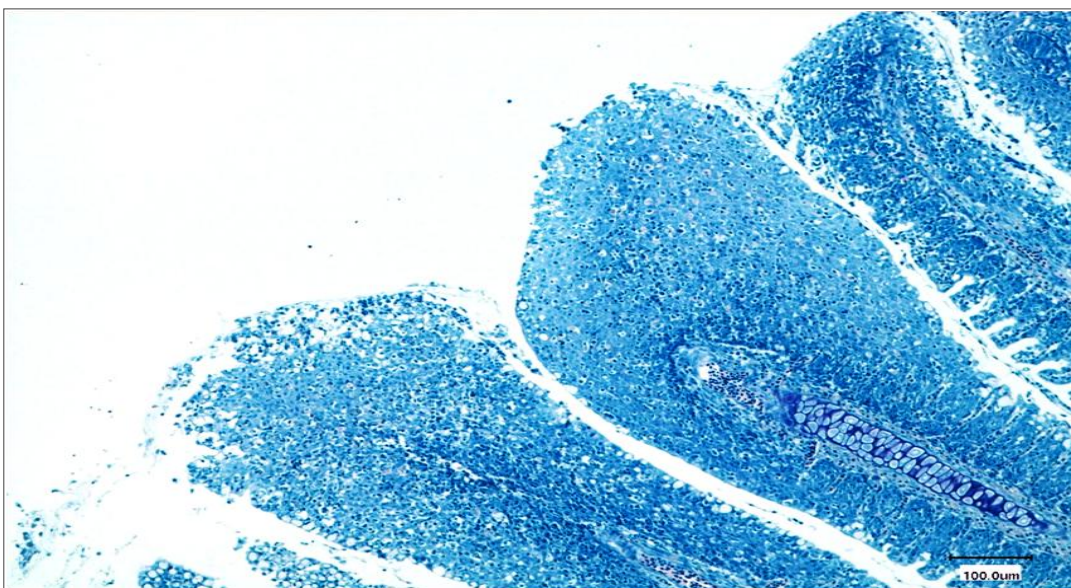


Figura 80: Grado 3, apici iperplastici con caratteristica dilatazione associata a sfaldamento cellulare (Giemsa).

- **Grado 4:** Il fenomeno iperplastico interessa la maggior parte dell'arco branchiale. I filamenti, colpiti per oltre i due terzi della loro lunghezza, mostrano ampie proliferazioni apicali (figura 81) e si fondono tra loro a gruppi di tre o quattro (figura 82). Associato a questo quadro è molto frequente lo sfaldamento cellulare, iperplasia ed ipertrofia delle cellule mucipare e necrosi epiteliale.

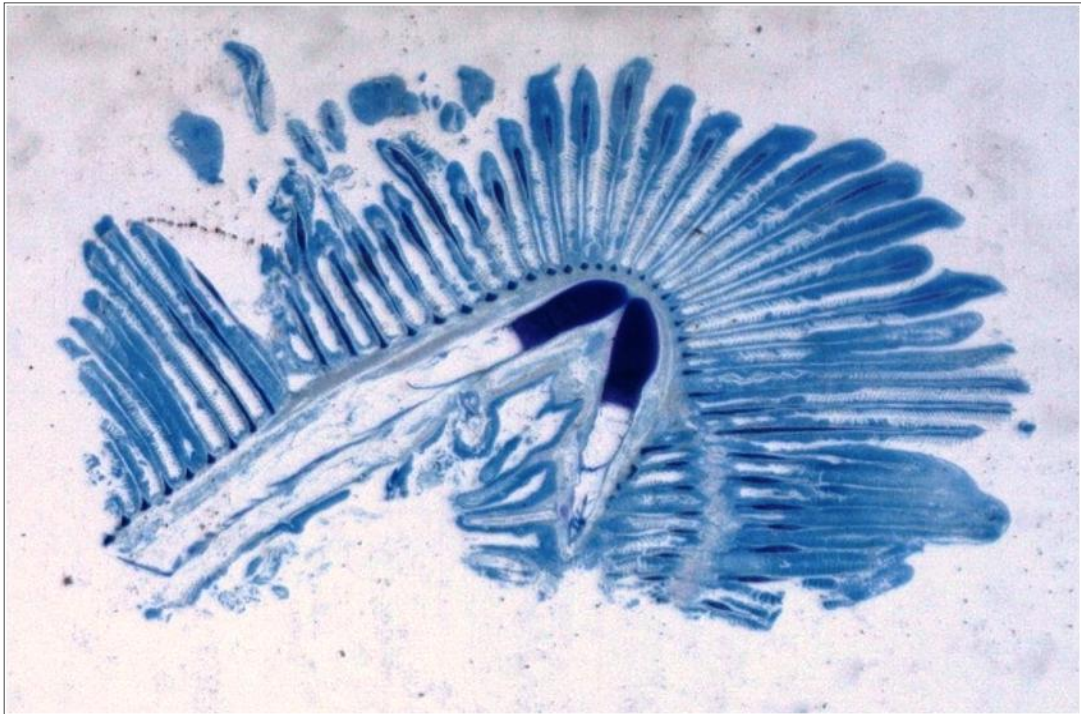


Figura 81: Grado 4, coinvolgimento della maggior parte della branchia, presenti fusioni di più filamenti (Giemsa).



Figura 82: Grado 4, accostamento di filamenti normali ed iperplastici (Giemsa).

- **Grado 5:** L'arco branchiale è completamente interessato dalla reazione proliferativa (figura 83). I filamenti, tutti completamente iperplastici, si fondono tra loro a gruppi di 5 o più creando un'unica massa di cellule in proliferazione (figura 84). Spesso si osservano quadri necrosi epiteliale, sfaldamenti cellulari ed iperplasia-ipertrofia delle cellule mucipare.

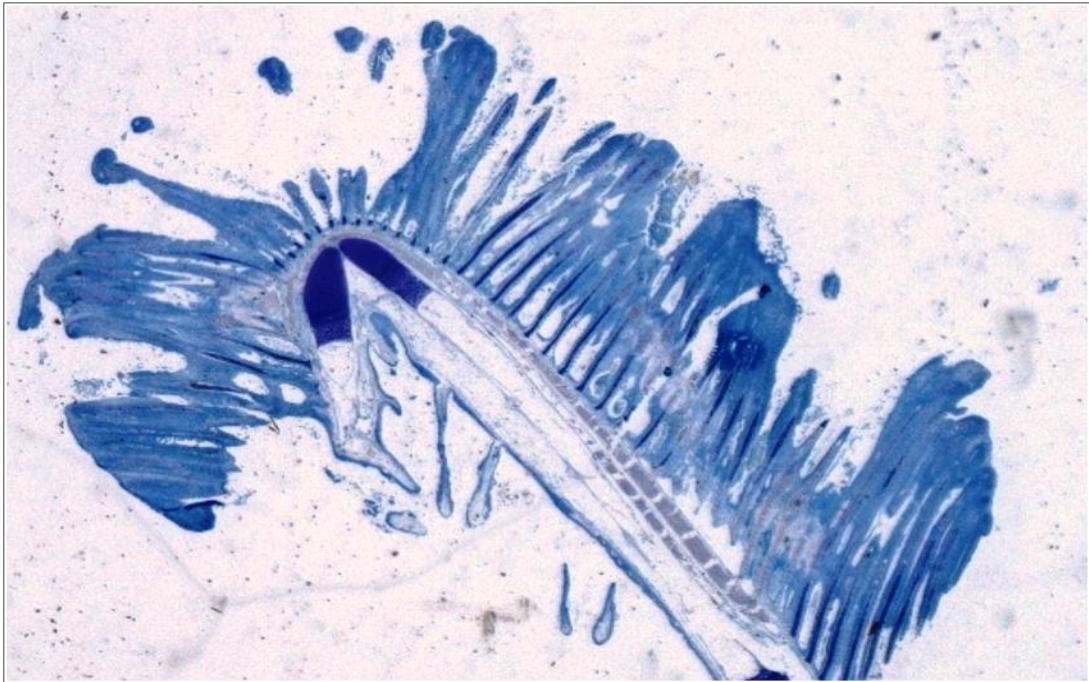


Figura 83: Grado 5, iperplasia con fusione quasi totale dei filamenti e sfaldamento cellulare (Giemsa).

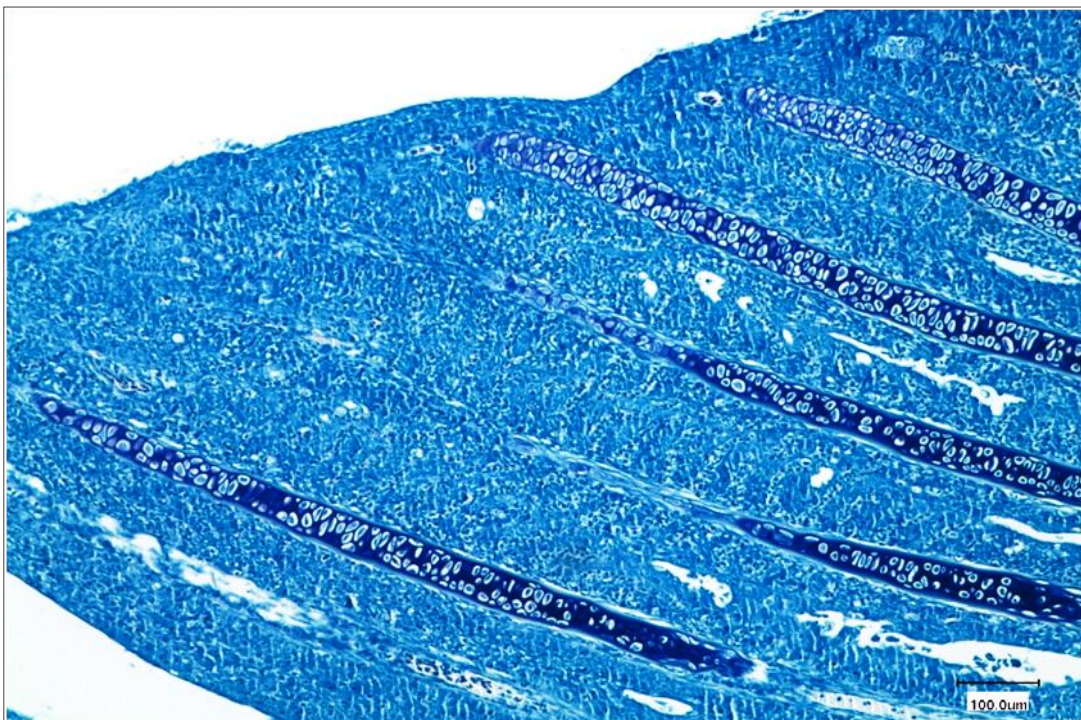


Figura 84: Grado 5, fusione di sette filamenti iperplastici tra loro (Giemsa).

2.3.1.9.2 Gradazione delle infestazioni da ameba

Come per la valutazione delle lesioni iperplastiche è stata eseguita una classificazione del livello di infestazione delle amebe con gradazione da 0 a 5 (Clark & Nowak, 1999).

- **Grado 0:** Assenza totale di amebe, sia incistate che libere.
- **Grado 1:** Presenza di rare amebe isolate, incistate lungo la superficie (figura 85).

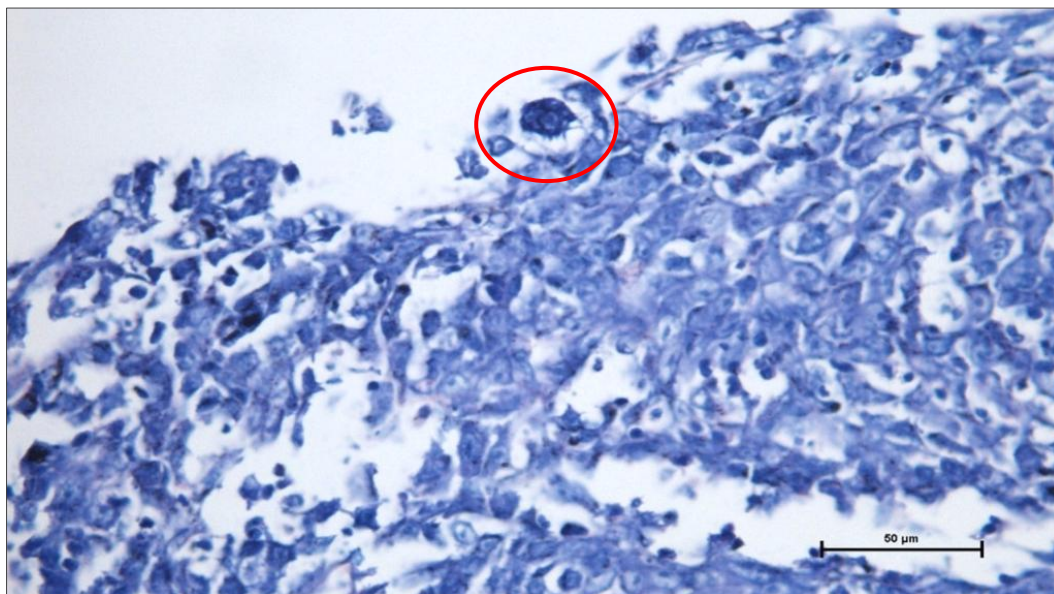


Figura 85: Grado 1, singola ameba incistata nella superficie iperplastica del filamento (*Giemsa*).

- **Grado 2:** Gruppi radi da tre a quattro amebe, lungo la superficie tissutale (principalmente a livello apicale), sia incistate che libere (figura 86).

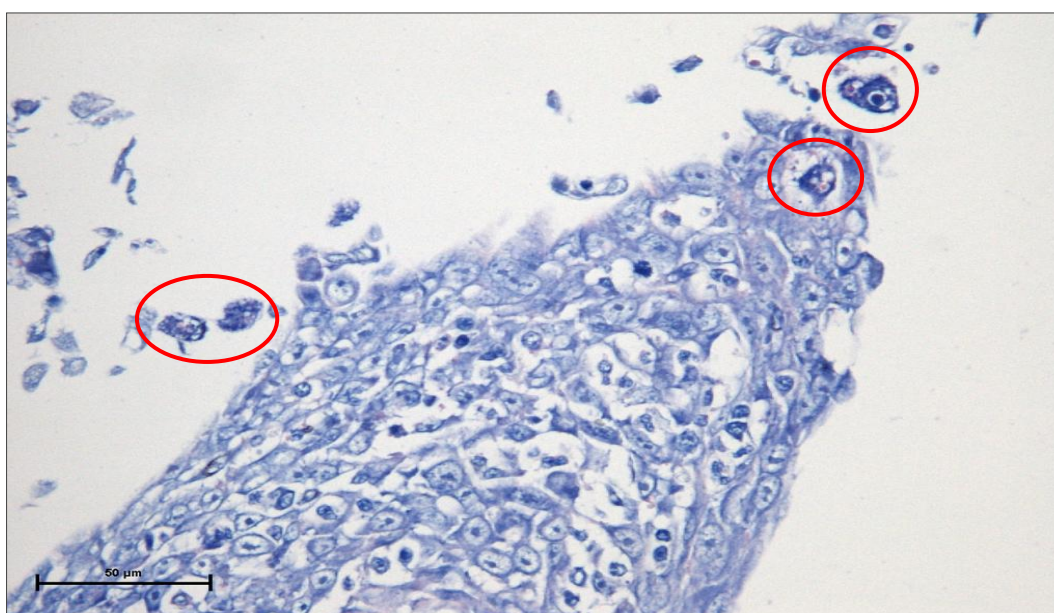


Figura 86: Grado 2, piccoli gruppi di amebe lungo la superficie in sfaldamento di un filamento iperplastico (*Giemsa*).

- **Grado 3:** Presenza di gruppi di oltre 5 amebe, incistate o disposte in sequenza sulla superficie epiteliale, nella maggior parte dei filamenti iperplastici (figura 87).

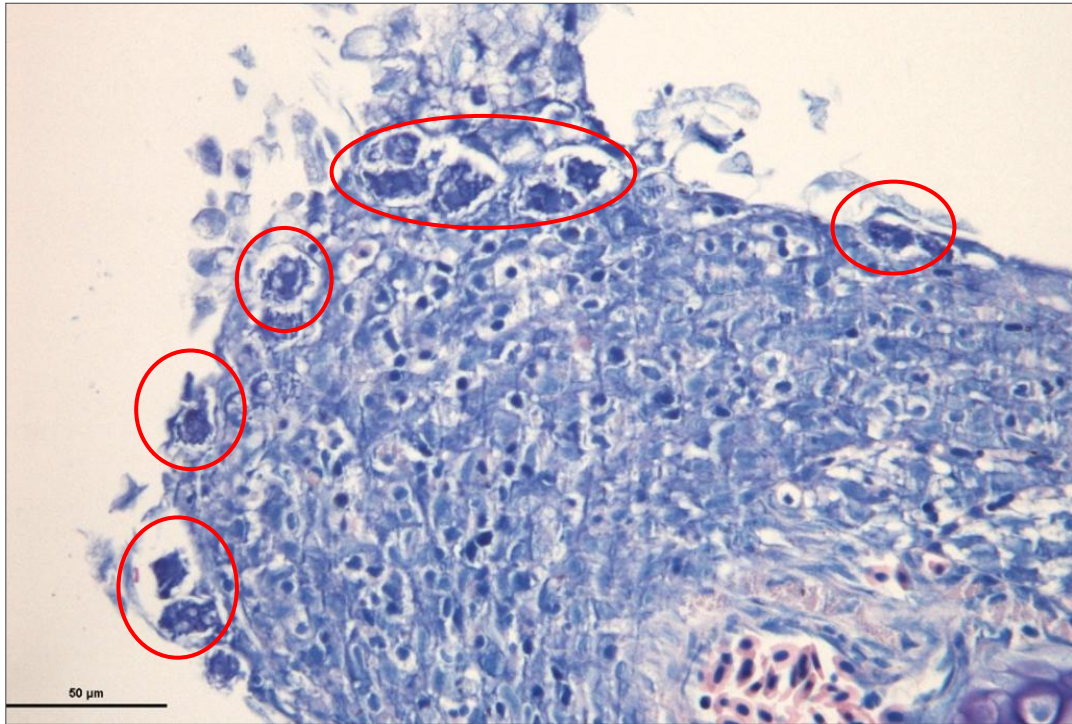


Figura 87: Grado 3, raggruppamento di amebe incistate lungo l'apice di un filamento iperplastico (*Giemsa*).

- **Grado 4:** Sequenze continue di amebe disposte lungo la superficie dei filamenti iperplastici (figura 88). Possono essere presenti numerosi cluster di amebe incistate.

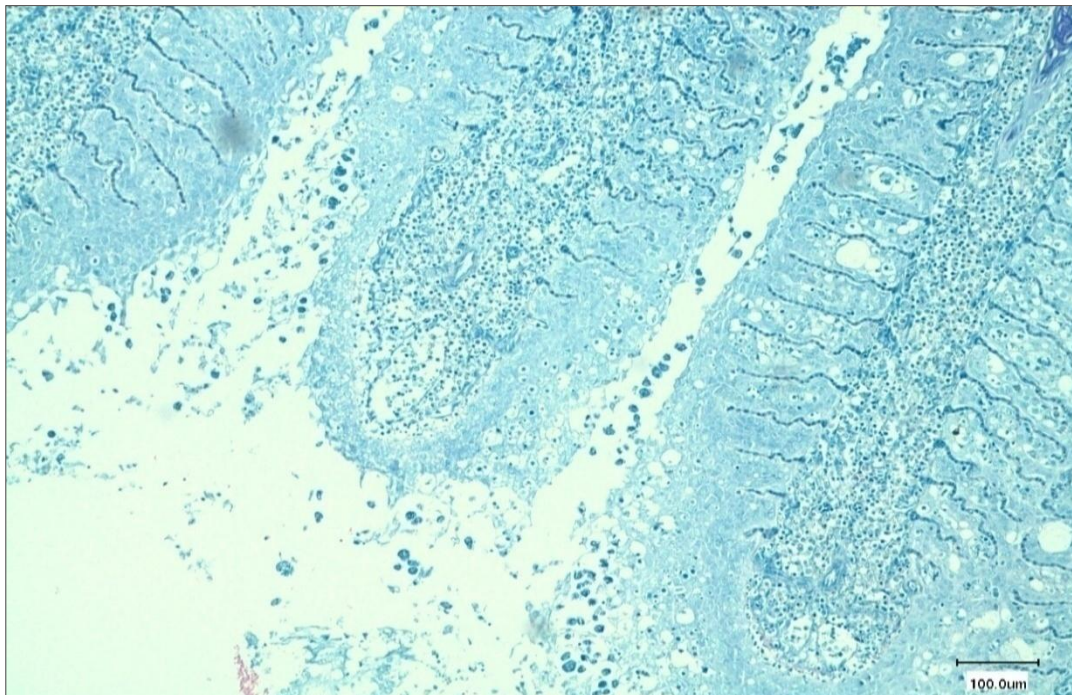


Figura 88: Grado 4, sequenze di amebe circondano tre filamenti iperplastici, sono presenti sfaldamento cellulare e congestione vascolare (*Giemsa*).

- **Grado 5:** Cluster di amebe che, oltre a rivestire i filamenti iperplastici, occupano completamente lo spazio compreso tra le due strutture (figura 89 e 90).

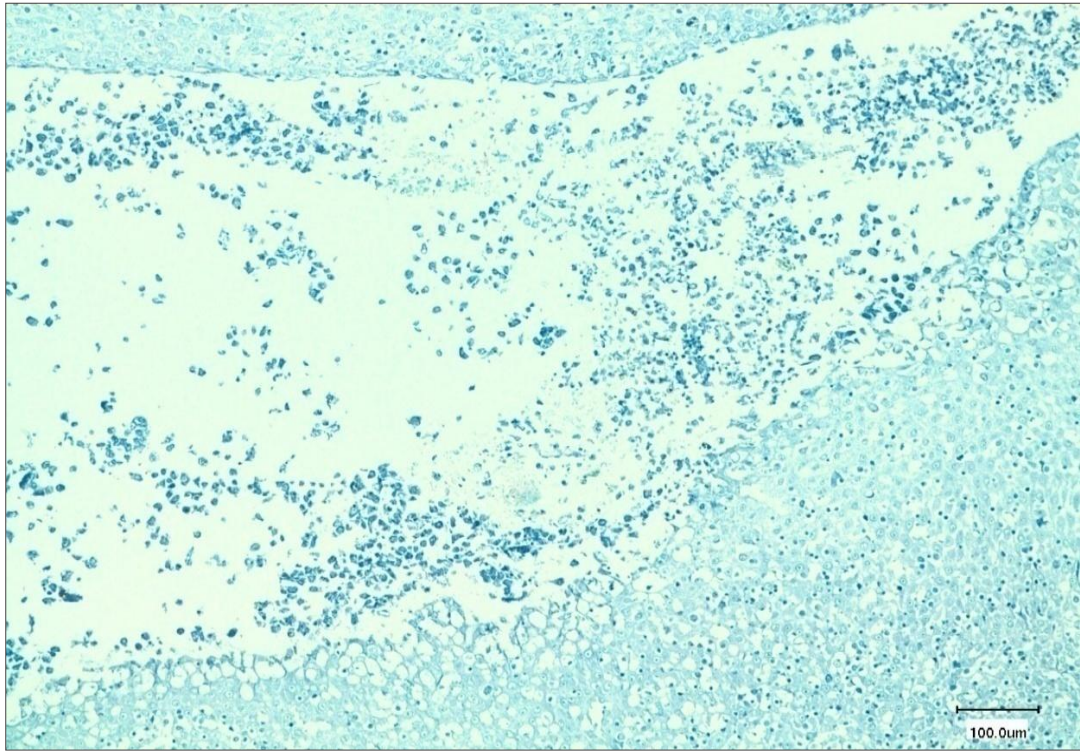


Figura 89: Grado 5, cluster di amebe situata tra due filamenti, presenti molti detriti cellulari (*Giemsa*).

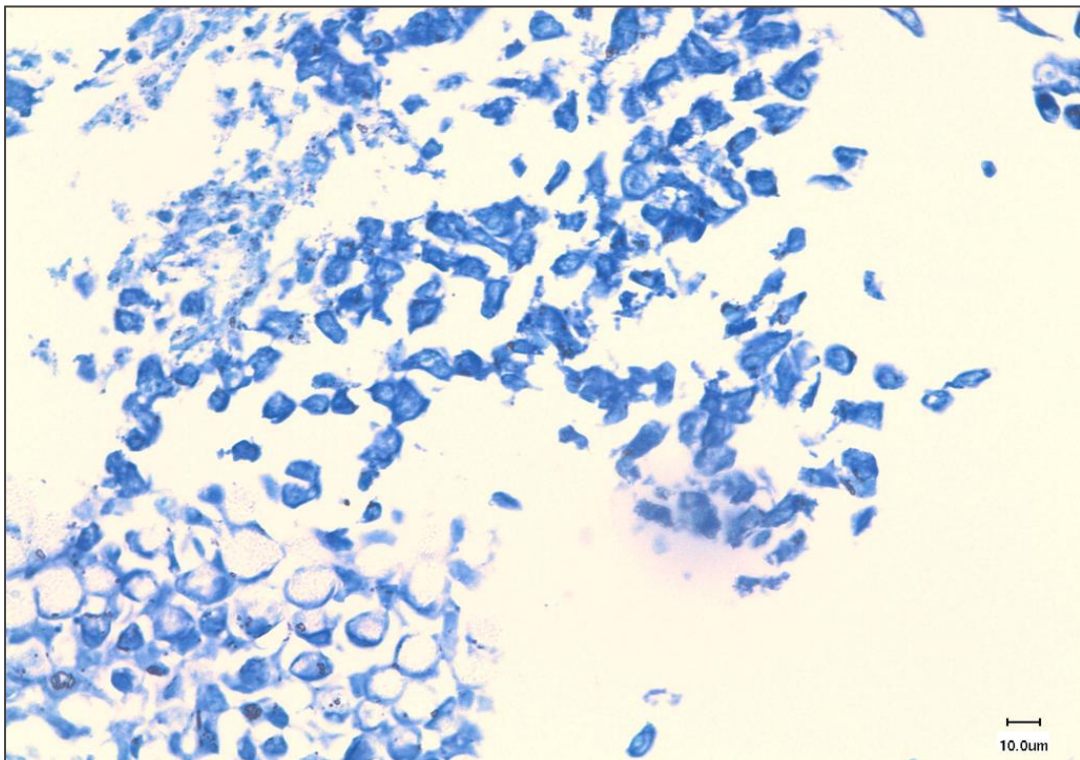


Figura 90: Grado 5 cluster di amebe frammiste a detriti (*Giemsa*).

La valutazione istologica ha evidenziato amebe in presenza di lesioni iperplastiche in tutte le branchie delle trote nelle vasche monitorate degli allevamenti 1, 2, 3, 4 ad esclusione della vasca C del secondo allevamento nel mese di febbraio. Le trote nella vasca H dell'allevamento 5 risultavano negative per amebe e non presentavano lesioni branchiali. Il valore medio del grado di iperplasia e di infestazione di amebe, osservate nelle trote delle vasche nei singoli allevamenti durante il periodo dell'indagine, è riportato in figura 91.

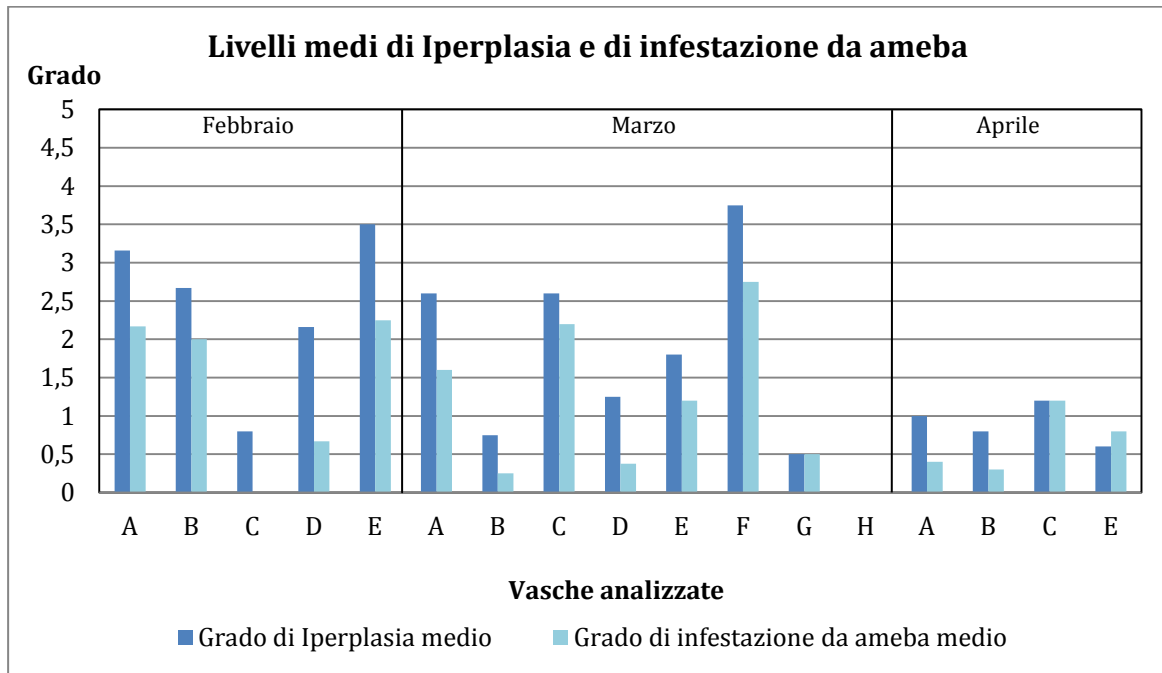


Figura 91: Grado di iperplasia medio e grado di infestazione di amebe medio osservati nelle vasche durante i mesi del monitoraggio.

2.3.1.10 Esiti delle altre Colorazioni Istologiche

Le colorazioni di Feulgen, Ziehl-Neelsen, PAS e Tricromica di Masson effettuati su archi branchiali iperplastici e positivi ad ameba non sono risultate idonee per il riconoscimento del parassita in quanto, con queste colorazioni istochimiche, non si differenziavano i microorganismi dal tessuto circostante (figure 92, 93, 94 e 95).

Con la colorazione Tricromica di Masson non sono state osservate reazioni fibrose.

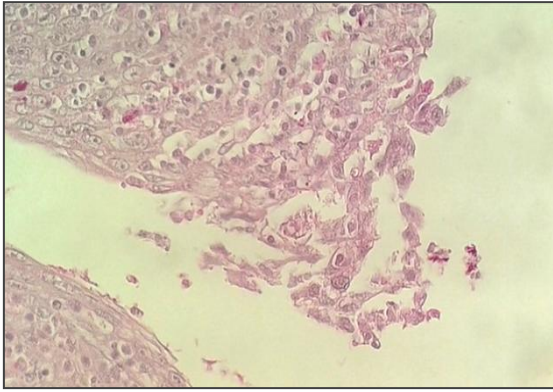


Figura 92: amebe frammiste a cellule in sfadamento (PAS).

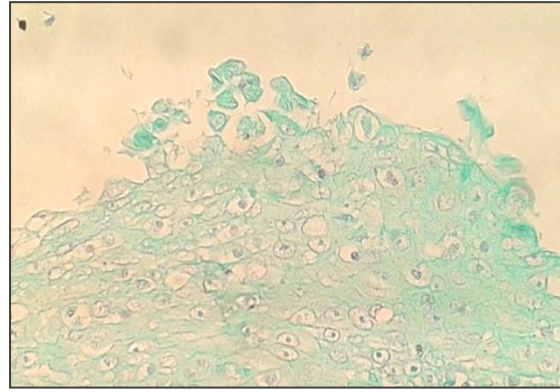


Figura 93: amebe incistate sulla superficie del filamento (Feulgen).

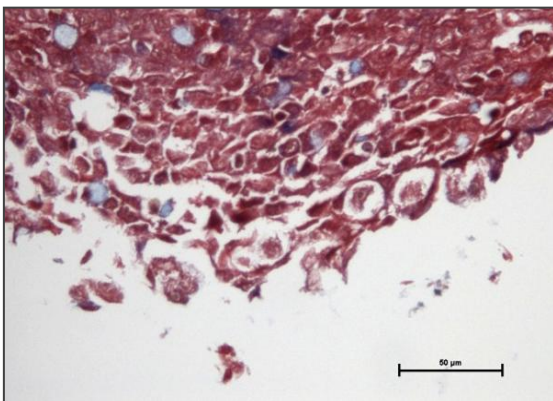


Figura 94: Amebe incistate sulla superficie del filamento (Tricromica di Masson)

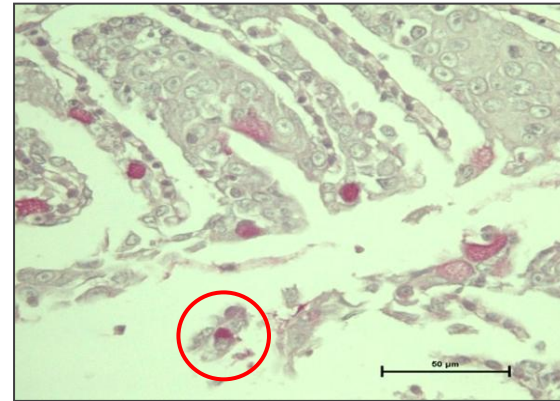


Figura 95: Ameba frammista a detriti cellulari (Ziehl-Neelsen)

2.3.2 RISULTATI DELLA SECONDA FASE DI MONITORAGGIO

Gli esami istologici, eseguiti su branchie di trote campionate durante tutte le stagioni dell'anno, hanno mostrato la presenza di alterazioni iperplastiche indipendentemente dal mese del prelievo.

Le lesioni proliferative sono state osservate in trote provenienti da 12 trotilcolture su 13, comprese le due trotilcolture situate in Veneto e nelle Marche.

In 48 vasche su 56 sono state trovati pesci che mostravano branchie con segni di iperplasia superiori al grado 1 mentre nelle restanti 8 le lesioni tissutali osservate erano minime o nulle (tabella 6).

I pesci provenienti dalla stessa vasca e prelevati nello stesso periodo mostravano lesioni iperplastiche di gravità simili fra loro.

La presenza di amebe è stata riscontrata in 11 allevamenti sui 13 oggetto di indagine (compresi gli stabilimenti in Veneto e nelle Marche), le vasche positive al parassita e il

mezzo del prelievo sono riportate in tabella 6. Trote provenienti dalla stessa vasca e prelevate nello stesso periodo presentavano infestazioni di gravità simile.

I parassiti sono stati osservati durante tutte le stagioni dell'anno. E' stato riscontrato un aumento del numero di branchie presentanti grado 5 da infestazione da amebe (cluster di parassiti tra i filamenti) durante i mesi estivi ed inizio autunnali.

Nelle vasche dove non è stata riscontrata presenza di amebe sono state osservate trote con branchie presentanti lesioni iperplastiche lievi (grado 1) o nulle (grado 0).

Tabella 6: Presenza di lesioni iperplastiche ed infestazioni da ameba nelle vasche riscontrate durante il secondo monitoraggio.

Allev.	Vasche	Area allev.	Vasche con trote con iperplasia branchiale e periodo del rilevamento	Vasche con trote positive ad ameba e periodo del rilevamento
1	A	Giudicarie	Positiva: Dic-Gen-Feb-Mar-Apr	Positiva: Dic-Gen-Feb-Mar-Apr
1	B	Giudicarie	Positiva: Feb-Mar-Apr	Positiva: Feb-Mar-Apr
1	1a	Giudicarie	Positiva: Dic-Gen	Positiva: Dic-Gen
1	1b	Giudicarie	Positiva: Ott	Negativa: Ott
1	1c	Giudicarie	Positiva: Nov-Dic	Positiva: Nov-Dic
1	1d	Giudicarie	Positiva: Apr	Positiva: Apr
2	C	Giudicarie	Positiva: Feb-Mar-Apr	Positiva: Mar-Apr Negativa: Feb
2	D	Giudicarie	Positiva: Gen-Feb-Mar	Positiva: Gen-Feb-Mar
2	2a	Giudicarie	Negativa: Ago	Negativa: Ago
2	2b	Giudicarie	Negativa: Ott	Negativa: Ott
2	2c	Giudicarie	Positiva: Nov	Positiva: Nov
3	E	Giudicarie	Positiva: Feb-Mar-Apr	Positiva: Feb-Mar-Apr
3	3a	Giudicarie	Positiva: Dic	Positiva: Dic
4	F	Giudicarie	Positiva: Mar	Positiva: Mar
4	G	Giudicarie	Positiva: Mar	Positiva: Mar
4	4a	Giudicarie	Positiva: Apr	Positiva: Apr
4	4b	Giudicarie	Positiva: Ago	Positiva: Ago
4	4c	Giudicarie	Positiva: Ago	Positiva: Ago
4	4d	Giudicarie	Positiva: Set-Ott- Dic	Positiva: Set-Ott-Dic
4	4e	Giudicarie	Negativa: Ott-Sett	Negativa: Set-Ott
4	4f	Giudicarie	Negativa: Ott	Negativa: Ott
5	H	Alto Brenta	Negativa: Mar	Negativa: Mar
5	5a	Alto Brenta	Positiva: Mag	Positiva: Mag
5	5b	Alto Brenta	Positiva: Mag	Positiva: Mag
5	5c	Alto Brenta	Negativa: Lug	Negativa: Lug
6	6a	Giudicarie	Positiva: Mag	Positiva: Mag
6	6b	Giudicarie	Positiva: Mag	Positiva: Mag
6	6c	Giudicarie	Positiva: Mag	Positiva: Mag
6	6d	Giudicarie	Positiva: Mag	Negativa: Mag
6	6e	Giudicarie	Positiva: Mag	Positiva: Mag
6	6f	Giudicarie	Positiva: Mag	Positiva: Mag
6	6g	Giudicarie	Positiva: Mag	Positiva: Mag
6	6h	Giudicarie	Positiva: Ago-Ott	Negativa: Ago-Ott
6	6i	Giudicarie	Positiva: Lug	Positiva: Lug
6	6l	Giudicarie	Positiva: Lug	Positiva: Lug
6	6m	Giudicarie	Positiva: Lug	Positiva: Lug
6	6n	Giudicarie	Positiva: Lug	Negativa: Lug
6	6o	Giudicarie	Positiva: Dic	Positiva: Dic

Allev.	Vasche	Area allev.	Vasche con trote con iperplasia branchiale e periodo del rilevamento	Vasche con trote positive ad ameba e periodo del rilevamento
7	7a	Giudicarie	Positiva: Lug	Positiva: Lug
7	7b	Giudicarie	Positiva: Lug	Positiva: Lug
7	7c	Giudicarie	Negativa: Lug	Negativa: Lug
7	7d	Giudicarie	Positiva: Lug	Positiva: Lug
7	7e	Giudicarie	Positiva: Lug	Positiva: Lug
7	7f	Giudicarie	Positiva: Lug	Positiva: Lug
7	7g	Giudicarie	Positiva: Lug	Positiva: Lug
7	7h	Giudicarie	Positiva: Lug	Positiva: Lug
7	7i	Giudicarie	Positiva: Ott	Positiva: Ott
7	7l	Giudicarie	Positiva: Ott	Negativa: Ott
7	7m	Giudicarie	Positiva: Ott	Positiva: Ott
7	7n	Giudicarie	Positiva: Ott	Negativa: Ott
8	8a	Giudicarie	Positiva: Feb-Apr	Negativa: Feb Positiva: Apr
9	9a	Giudicarie	Positiva: Dic	Negativa: Gen
10	10a	Giudicarie	Positiva: Gen	Positiva: Gen
11	11a	Alto Garda	Negativa: Gen	Negativa: Gen
12	12a	Veneto	Positiva: Apr	Positiva: Apr
13	13a	Umbria	Positiva: Apr	Positiva: Apr

2.3 DISCUSSIONE

Le indagini, effettuate negli allevamenti di trota iridea che riferivano aumenti di mortalità con sintomatologia respiratoria, hanno permesso di individuare la presenza di gravi reazioni proliferative del tessuto branchiale associate ad amebe adese alla superficie dei filamenti iperplastici o incistate.

I protozoi dell'ordine delle amebe sono microrganismi eucarioti ubiquitari nel suolo e nell'ambiente acquatico. Si nutrono di varie popolazioni batteriche nel terreno. Prevalgono tra i protozoi in acque dolci e sono microrganismi abituali di acque costiere e sedimenti marini. Le amebe, un tempo considerati protozoi a vita libera, sono in grado di invadere i tessuti di organismi ospite. Tali organismi sono anfizoici in grado cioè di compiere autonomamente il loro ciclo biologico libero nell'ambiente, ma capaci anche di adattarsi alla vita parassitaria. Diverse specie sono state riconosciute come gravi patogeni degli esseri umani, vertebrati inferiori e invertebrati. L'attenzione dei ricercatori è stata rivolta alla prevalenza di amebe libere in habitat acquatico, mentre la loro presenza nei pesci è stata trascurata per un lungo periodo di tempo. La conoscenza delle cause di malattia e fattori ad esse correlati, così come la ricerca di patogeni emergenti e potenziali, è di fondamentale importanza.

Le amebe, al confronto con altri microrganismi eucarioti che infettano le specie ittiche, non hanno ricevuto ad oggi sufficiente attenzione. In letteratura vi sono pubblicazioni sull'isolamento ed identificazione di molte specie di amebe negli organismi acquatici. Alcuni riscontri sono accidentali e non sono associati a condizioni patologiche, altri sono correlati a morbilità e mortalità. Kent et al. (1988) descrive *Paramoeba pemaquidensis*, in seguito riclassificata *Neoparamoeba pemaquidensis* (Dycova et al., 2000), come agente eziologico primario di "Amoebic gill disease" (una delle più importanti patologie dei salmonidi d'allevamento).

La malattia è stata segnalata per la prima volta da Munday (1986) negli allevamenti marini di salmone atlantico (*Salmo salar*) e di trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*) della Tasmania sudorientale (Australia). Kent et al. (1988) riportava casi di AGD negli allevamenti statunitensi di salmone argentato (*Oncorhynchus kisutch*). Nell'arco di vent'anni la malattia è stata segnalata in altri paesi produttori di salmonidi marini come l'Irlanda e Spagna (Rodger & McArdle, 1996), Francia (Findlay & Munday, 1998), Nuova Zelanda (Munday et al., 2001), Norvegia, Scozia (Steinum et al., 2008), Cile (Bustos et al., 2011) e Sudafrica (Mouton et al., 2014).

L'isolamento di *Neoparamoeba branchiophila* (Dykova et al. 2005) e dei generi *Platyamoeba* e *Vannella* (Bermingham & Mulcahy, 2004) ha fatto sospettare il possibile coinvolgimento di più specie nello sviluppo di AGD.

Recentemente è stata segnalata *Neoparamoeba perurans*, una nuova specie, negli allevamenti di salmone atlantico in Tasmania (Young et al., 2007). Young et al. (2008) in uno studio successivo hanno isolato solo questa specie da branchie di pesci affetti da AGD provenienti da vari paesi: tale risultato ha confermato la *N. perurans* come uno dei principali agenti eziologici dell'AGD.

La specie più interessata dalla malattia è risultata essere il salmone atlantico (*Salmo salar*) seguita dalla trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*) allevata in ambiente marino (Munday et al., 2001). La malattia è stata riscontrata in molte specie di salmonidi tra cui il salmone argentato (*Oncorhynchus kisutch*), il salmone reale (*Oncorhynchus tshawitsha*) e la trota di mare (*Salmo trutta trutta*). Altri episodi di AGD sono stati osservati da Dykova & Novoa (2001) negli allevamenti di rombo chiodato (*Schophthalmus maximus*) in Spagna (Dykova et al., 1995), nel branzino (*Dicentrarchus labrax*) e nel sarago pizzuto (*Diplodus puntazzo*).

L'Amoebic gill disease provoca nei pesci evidente difficoltà respiratoria, letargia ed anoressia, specialmente nei soggetti giovani. E' stato descritto un aumento della frequenza dei movimenti opercolari per facilitare gli scambi gassosi (Fisket et al., 2002).

Macroscopicamente sono osservate lesioni branchiali, caratterizzate da un aspetto proliferativo con ipermucosità ed alternanza di aree anemiche e congeste, maggiormente diffuse nella parte dorsale dell'arco branchiale (Adams & Nowak, 2001).

All'esame istologico, in corrispondenza delle lesioni anatomopatologiche osservate macroscopicamente, si osserva un'intensa iperplasia del tessuto epiteliali che porta alla completa fusione delle lamelle (Munday et al., 1990) e, nei casi più gravi, dei filamenti stessi (Rodger & McArdle, 1996).

Le coalescenze delle porzioni distali dei filamenti possono provocare la formazione di cavità interlamellari. Fra le cellule dell'epitelio iperplastico delle lamelle si osservano cellule mucipare ipertrofiche ed infiltrato flogistico (Clark & Nowak, 1999).

La malattia si caratterizza per la presenza di trofozoiti di ameba, di diametro compreso tra i 20 µm e i 30 µm, con un nucleo circolare, uno o due parasomi adiacenti e citoplasma vacuolizzato (Munday et al., 1990). Le amebe possono essere incistate sulla superficie dell'epitelio iperplastico o contenute in vacuoli formati con la fusione delle lamelle

(Palmerr et al., 1997). Il maggior numero di microorganismi si osserva distribuito lungo la superficie iperplastica del filamento (Munday et al., 2001).

E' stato dimostrato che, durante la malattia, nel salmone atlantico e nella trota di mare si sviluppa ipertensione sistemica, mentre tale fenomeno non è stato osservato nella trota iridea (Powell et al., 2002).

Douglas-Helders et al. (2002) sottolineano come i vettori di AGD negli allevamenti siano sconosciuti e ritengono che i pesci selvatici non abbiano un ruolo significativo nella diffusione. Gli autori hanno osservato in Tasmania come, di fronte a elevatissime infestazioni delle branchie dei salmoni allevati, fosse raro il riscontro del parassita in pesci selvatici.

L'Amoebic gill disease si manifesta a con temperature dell'acqua comprese tra 12°C e 20°C (Douglas-Helders et al., 2001), sebbene siano stati segnalati soggetti affetti anche con temperature inferiori a 10°C (Munday et al., 1990). Altro fattore essenziale per lo sviluppo della malattia è il tasso di salinità dell'acqua, che deve essere superiore al 32‰ (Clark & Nowak, 1999).

E' stato stimato che la patologia gravi tra il 10% e il 20% sui costi di produzione dell'allevamento dei salmoni in Tasmania. In media la mortalità settimanale da AGD varia dal 2% al 10% della partita, a seconda della taglia dei pesci (Foster & Percival, 1988b). Sono stati descritti casi in cui le mortalità cumulative in vasca ha superato l'80% (Steinum et al., 2008).

Foster e Percival (1988a) sono stati i primi a sostenere l'efficacia del trattamento con acqua dolce per 2 o 6 ore. Il trattamento provoca la rimozione del muco in eccesso e l'eliminazione di buona parte delle amebe (Munday et al., 1990). Sono inoltre stati osservati rilevanti miglioramenti nelle branchie dei pesci colpiti dopo trattamenti con levamisolo (farmaco antielmintico e immunomodulatore) portando precedentemente il pH della vasca a 7 (Clark & Novak, 1999). L'impiego di cloramina T e diossido di cloro in associazione ai bagni in acqua dolce aumentano l'efficacia del trattamento (Powell & Clark, 2004).

Il quadro da noi osservato, nell'ambito delle indagini è riconducibile a malattia nodulare branchiale (NGD) della trota iridea.

La Nodular gill disease, sostenuta da amebe, è un'importante patologia delle specie di salmoni allevate in acqua dolce. La Malattia è stata descritta, nei primi anni ottanta del secolo scorso, negli allevamenti di trota iridea in Canada (Daoust & Ferguson 1985; 1986) e negli anni novanta negli Stati Uniti (Bullock et al., 1994), la malattia si è poi diffusa nel

continente europeo negli anni novanta. Hoffmann et al. (1992) descrivono in trote iridee allevate nel sud della Germania una malattia proliferativa branchiale di origine parassitaria, di cui non identificano l'agente eziologico, che presentava lesioni del tutto sovrapponibili alla malattia nodulare branchiale. Nel 2003 sono stati segnalati i primi casi di NGD negli allevamenti di trota iridea in Danimarca (Buchmann et al., 2004) seguiti da nuovi episodi in Polonia (Antychowicz, 2007), in Germania (Dykova et al., 2010) e recentemente in Repubblica Ceca (Dykova & Tyml, 2015). La specie maggiormente interessata dalla patologia è la trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*). Casi di Nodular gill disease sono stati descritti nei salmerini alpini (*Salvelinus alpinus*) allevati in Canada (Speare, 1999).

Nelle prime descrizioni la malattia nodulare è stata associata ad amebe appartenenti al genere *Cochliopodium*. Successive ricerche (Dykova et al., 2010) hanno dimostrato la presenza di amebe del genere *Naegleria* in associazione ad altre specie appartenenti ai generi *Acanthamoeba*, *Vermamoeba*, *Protacanthamoeba* e *Vannella*. Recentemente è stata isolata una nuova specie, *Rhogostoma minus*, in concomitanza con amebe dei generi *Acanthamoeba*, *Vermamoeba*, *Naegleria* e *Vannella* (Dykova et al., 2015).

Queste ricerche supportano l'ipotesi di un'etiologia multi specifica della NGD.

I pesci colpiti dalla malattia nodulare mostrano una sintomatologia molto simile alla AGD, caratterizzata da atassia natatoria, difficoltà respiratorie con opercoli divaricati da cui fuoriescono branchie con aspetto mucoso e rigonfio e lesioni nodulari biancastre di 1 o 2 mm.

All'istologia le lesioni descritte (Daoust & Ferguson, 1985; Buchmann et al., 2004; Dykova et al., 2010) sono sovrapponibili e simili a quelle osservate e descritte nella nostra indagine. Sembra esserci una correlazione tra la progressione delle alterazioni iperplastiche ed il grado di infestazione da ameba (Dykova et al., 2010).

La malattia nodulare è stata osservata sia in concomitanza della "Bacterial gill disease" (Speare, 1996) che in sua assenza (Buchman et al., 2004). A differenza di AGD non sono state individuati particolari condizioni ambientali che influenzino lo sviluppo di NGD. È stato descritto aggravamento dei quadri di malattia nodulare in concomitanza con fenomeni di torbide (Dykova & Tyml, 2015). Nella nostra indagine la presenza di solidi sospesi in acqua e di detriti sul fondo delle vasche non sembra aver influenzato l'andamento della malattia, essendo stata osservata prevalentemente a fine marzo ed inizio aprile (periodo delle torbide) quando la mortalità delle trote era in regressione.

L'ispezione delle vasche degli allevamenti oggetto di indagine ha mostrato pesci, in buono stato di nutrizione, con evidente difficoltà respiratoria che non presentavano altri sintomi clinici correlabili all'aumento della mortalità.

La vicinanza di più allevamenti che utilizzano acqua proveniente dallo stesso bacino idrico e la presenza di una sintomatologia sovrapponibile ci suggerisce l'ipotesi che la trasmissione avvenga per contaminazione e per diffusione attraverso le acque che defluiscono da più trotilture.

Le trote, una volta superata la malattia, non hanno più presentato mortalità associata ad ameba e potrebbe essere ipotizzata una risposta immunitaria specifica verso il patogeno.

I valori di ossigeno, misurati in tutte le vasche nella prima fase di monitoraggio, sono rimasti ampiamente al di sopra della soglia limite per la specie, 5 mg/L (sotto la quale si sviluppano gravi sintomatologie da insufficienza respiratoria e mortalità). In tutte le vasche, tranne la E a febbraio, sono state registrate concentrazioni di ossigeno disciolto superiori a 9 mg/l (considerato il livello ottimale di O₂ all'ingresso delle vasche). E' stato quindi escluso che le trote abbiano manifestato problemi di anossia per carenze di O₂ nell'acqua.

I valori di pH rilevati sono sempre stati all'interno dell'intervallo considerato ottimale per l'allevamento della trota iridea. E' stato escluso che tale fattore fosse alla base delle mortalità osservate o influisse negativamente su altri parametri.

Il pH acido determina perdita del rivestimento mucoso cutaneo, porta ad un incremento della secrezione a livello delle branchie, può influire sia sulla tossicità dei metalli pesanti (alluminio), rendendoli solubili, sia dell'anidride carbonica, spostano l'equilibrio della reazione $H_2O + CO_2 \rightleftharpoons H_2CO_3$ a favore della CO₂. Acque troppo basiche possono provocare lesioni cutanee, branchiali e corneali ed aggravare la tossicità dell'ammoniaca aumentando la quota indissociata.

La temperatura dell'acqua, misurata nei mesi invernali e primaverili, era compresa tra i 5,5°C e i 12,5°C. A tali valori il metabolismo delle trote rallenta, diminuisce l'accrescimento e cala il consumo di ossigeno. Le acque fredde, abbassando la domanda di O₂, possono essere considerate un fattore adiuvante per pesci che manifestano difficoltà respiratorie. In acque più calde le trote, aumentando il loro metabolismo, sono molto più sensibili ai cali di ossigeno (di norma la sintomatologia respiratoria si manifesta nei mesi caldi).

L'ammoniaca è normalmente presente in vasca sia come normale prodotto di scarto del metabolismo proteico delle trote sia come prodotto decomposizione della sostanza

organica. In acqua la forma di ammoniaca indissociata tossica, eliminata principalmente attraverso le branchie, reagisce formando ammoniaca dissociata (ioni ammonio) meno dannosa per l'animale. L'equilibrio tra le due forme, in acqua, dipende dal pH e dalla temperatura, più alti sono questi valori e maggiore è la percentuale di ammoniaca indissociata. L' NH_4^- svolge un'azione irritativa verso il tessuto branchiale, specialmente nei soggetti giovani, ed è considerata uno dei fattori responsabili di malattia branchiale. I valori di ammoniaca indissociata, nelle vasche monitorate, sono stati sempre al di sotto del livello soglia: è quindi escluso che tale composto possa avere provocato la malattia branchiale od influito sulla mortalità.

Nitriti e nitrati sono prodotti dell'ossidazione dell'ammoniaca da parte di microorganismi del genere *Nitrosomonas* (che ossida l' NH_3 in nitriti) e *Nitrobacter* (che ossida i nitriti in nitrati). In acque ben ossigenate l'ammoniaca viene rapidamente trasformata in nitriti e poi in nitrati. In carenza di O_2 , i nitrati possono essere riconvertiti nuovamente in nitriti. La tossicità di NO_2^- è dovuta alla sua capacità di ossidare nei globuli rossi l'emoglobina in metaemoglobina. In tale situazione il sangue assume una tipica colorazione brunastra. La metaemoglobina negli eritrociti impedisce la cessione dell'ossigeno ai tessuti. Durante l'indagine sono stati rilevati valori di nitriti al di sotto del livello limite che non influenzavano la salute dei pesci.

Complessivamente non sono state osservate alterazioni dei parametri fisico-chimici delle acque che giustificassero la sintomatologia respiratoria e le alte mortalità osservate.

Alla necropsia sono state riscontrate con un'elevata frequenza congestioni epatiche indici di un diffuso stato di ipossia o ipercapnia riconducibile a problemi respiratori.

La reazione proliferativa del tessuto branchiale, osservata al microscopio a fresco nella maggior parte dei campioni, è stata l'unica alterazione che possa giustificare la sintomatologia respiratoria e l'elevata mortalità.

Le proliferazioni tissutali sono state di tipo cronico e caratteristiche di una malattia a lenta progressione. L'abbondante quantità di muco riscontrata sulle branchie è indice di un fenomeno irritativo non giustificato dalla scarsa presenza di detriti tra i filamenti.

All'esame batteriologico sono risultate positive, per il genere *Flavobacterium*, solo 6 branchie su 98 (6,1%). All'esame istologico le branchie positive per *Flavobacterium* mostravano alterazioni tissutali di gravità variabile, comprese tra grado 1 e grado 5. Il basso numero di campioni positivi all'esame batteriologico e la variabilità delle lesioni delle branchie positive ai mixobatteri escludono che tali microorganismi, sebbene

considerati uno dei fattori aggravanti della patologia, siano stati l'agente eziologico primario.

All'istologia, seppur raramente, sono stati osservati alcuni archi branchiali interessati da intensa proliferazione batterica mista dove prevaleva un quadro di tipo necrotico con scarse lesioni iperplastiche (gradi di iperplasia lievi 1 o 2). Al contrario nei campioni, in cui sono state osservate intense reazioni proliferative era presente uno scarso numero di batteri.

Il ridotto numero di branchie interessato da proliferazione batterica ha fatto escludere che tali microorganismi siano stati la causa alla base delle mortalità.

Le alterazioni del tessuto branchiale, rilevate all'istologia, hanno confermato il riscontro dell'esame microscopico a fresco. La gravità e l'estensione delle lesioni iperplastiche osservate non trova confronto con le malattie branchiali tradizionali, descritte nelle trote colture italiane (capitolo 1.5) prima di questa nuova forma morbosa. Un quadro proliferativo di tale intensità era simile a quanto descritto in AGD dei salmonidi e NGD delle trote. L'osservazione del parassita ha confermato il sospetto eziologico.

L'identificazione delle amebe in sezioni di tessuto istologico può essere difficile in quanto, spesso, non mantengono le caratteristiche morfologiche dopo la fissazione e la colorazione. Tuttavia, alcuni tratti caratteristici delle amebe possono essere visibili, come i vacuoli citoplasmatici ed alcune caratteristiche del nucleo, come la dimensione e la posizione dell'endosoma (nucleolo), (Bruno et al. 2006). La colorazione di Giemsa da noi adottata sembra essere un buon ausilio diagnostico.

L'esame parassitologico ha permesso l'individuazione di trofozoiti di ameba.

Nonostante, non sia ancora chiaro il meccanismo patogenetico dell'ameba nella determinazione delle lesioni branchiali, il parassita è considerato uno fra i più importanti patogeni che causa di gravi perdite economiche mondiali nell'allevamento dei salmonidi.

La presenza di ameba in allevamenti di trota iridea non è stata mai descritta in Italia prima delle nostre osservazioni e, dalla nostra indagine, risulta presente in Trentino (9 su 11 allevamenti esaminati) ed in altre regioni italiane (Veneto e Marche).

Il riscontro di amebe nelle lesioni branchiale è avvenuto durante tutto il periodo dell'anno. E' quindi da escludere che si tratti di una patologia esclusivamente invernale, come riferito inizialmente dagli allevatori.

In alcuni allevamenti i prelievi effettuati durante i mesi estivi hanno evidenziato elevata presenza di amebe (grado 5) con lesioni iperplastiche in fase evolutiva. Le lesioni proliferative più gravi (grado 5) sono state osservate in inverno con un minor numero di parassiti rispetto all'estate.

Da quanto osservato si può ipotizzare che la malattia abbia inizio con l'avvento dell'estate con un elevato numero di amebe che provocano fenomeni iperplastici che cronicizzano nella stagione invernale, quando si riscontra un minor numero di parassiti.

Ulteriori studi devono essere effettuati al fine di conoscere l'andamento della malattia.

2.4 CONCLUSIONI

Le indagini, effettuate negli allevamenti di trota iridea che riferivano aumenti di mortalità con sintomatologia respiratoria, hanno permesso di individuare la presenza di gravi reazioni proliferative del tessuto branchiale associate ad amebe incistate o adese alla superficie dei filamenti iperplastici. Il quadro osservato è riconducibile a quanto riportato per la NGD della trota iridea. Tale patologia, segnalata in Nord Europa ed America settentrionale, non era mai stata descritta prima d'ora in Italia.

I monitoraggi hanno evidenziato la presenza del parassita in allevamenti situati in Trentino, Veneto e Marche. Dato il ruolo leader che il nostro paese ricopre nella produzione di trote iridee nell'Unione Europea, ulteriori studi sono necessari per conoscere la diffusione del parassita a livello nazionale e i danni economici ad esso associati.

Le conoscenze sulla malattia branchiale nodulare da amebe sono ancora limitate, sebbene recenti ricerche, mediante tecniche di biologia molecolare, abbiano individuato alcune delle specie di ameba responsabili della patologia (Dykova et al., 2010; 2015). Studi approfonditi appaiono necessari per chiarire gli aspetti eziopatogenetici della malattia, individuare eventuali cofattori di natura ambientale, gestionale e biologica che possano favorire l'instaurarsi della malattia branchiale nodulare da ameba e stabilire idonee misure di profilassi e terapia.

BIBLIOGRAFIA

- Adams M.B. (1999). The effects of ammonia and nitrite on the respiratory physiology and morphology of the juvenile big bellied seahorse *Hippocampus abdominalis*. *Bachelor of the Applied Sciences*. Honours thesis. University of Tasmania, Launceston.
- Adams M.B. & Nowak B.F. (2001). Distribution and structure of lesions in the gills of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., affected with amoebic gill disease. *Journal of Fish Diseases* 24: 535-542.
- Adams M.B. & Nowak B.F. (2003). Amoebic gill disease: Sequential pathology in cultured Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases* 26: 601-614.
- Adams M.B. & Nowak B.F. (2004a). Experimental amoebic gill disease of Atlantic salmon, *Salmo salar* L.: Further evidence for the primary pathogenic role of *Neoparamoeba* sp. (Page, 1987). *Journal of Fish Diseases* 27: 105-113.
- Adams M.B. & Nowak B.F. (2004b). Sequential pathology after initial freshwater bath treatment for amoebic gill disease in cultured Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases* 27: 163-173.
- Alborali L. & Carboni A. (1997). Guida pratica di Acquacoltura e Ittiopatologia. *La Selezione Veterinaria* 12: 123-158.
- Amend D.F. (1975) Detection and transmission of infectious hematopoietic necrosis virus in rainbow trout. *Journal of Wildlife Diseases* 11: 471-478.
- Antychowicz J. (2007). Study on rainbow trout nodular gill disease detected in Poland. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy* 51: 547-551.
- API. (2014) La Piscicoltura Italiana, *dati riferiti anno 2013*. <http://www.api-online.it/>
- Bass M.L. & Heath A.G. (1977). Cardiovascular and respiratory changes in rainbow trout, *Salmo gairdneri*, exposed intermittently to chlorine. *Water research* 11: 497-502.
- Bermingham M.L. & Mulcahy M.F. (2004). Environmental risk factors associated with amoebic gill disease in cultured salmon, *Salmo salar* L., smolts in Ireland. *Journal of Fish Diseases* 27: 555-571.

- Borroni. I. (2007). Aspetti del ciclo d'allevamento della trota. Tecniche di allevamento e trasformazione della trota. Ed. G. Baruchelli. San Michele all'Adige, Trento. Edizioni IASMA. pp. 12-44.
- Borroni I. & Bovo G. (2007). Patologie branchiali: cause e rimedi. Tecniche di allevamento e trasformazione della trota. Ed. G. Baruchelli. San Michele all'Adige, Trento. Edizioni IASMA. pp. 285-306.
- Boucher P. & Baudin F. (1994). Sleeping disease (SD) of Salmonids. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 14: 179-186.
- Bovo G. (2007). Principali malattie virali dei salmonidi allevati in Italia. Tecniche di allevamento e trasformazione della trota. Ed. G. Baruchelli. San Michele all'Adige. Trento: Edizioni IASMA. pp. 241-270
- Bovo G., Giorgetti G., Jorgensen P.E.V. & Olesen N.J. (1987). Infectious Haematopoietic Necrosis: First Detection In Italy. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 7: 124-128.
- Branson E. (2002). Sleeping disease in trout. *Veterinary Record* 150: 759-760.
- Bruno D.W., Nowak B. & Elliot D.G. (2006). Guide to the identification of fish protozoan and metazoan parasites in stained tissue sections. *Diseases of Aquatic Organisms* 70: 1-36.
- Buchmann K., Nielsen T., Sigh J. & Bresciani J. (2004). Amoebic gill infections of rainbow trout in freshwater ponds. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 24: 87-91.
- Bullock G., Herman R., Heinen J., Noble A., Weber A. & Hankins J. (1994). Observations on the occurrence of bacterial gill disease and amoeba gill infestation in rainbow trout cultured in a water recirculation system. *Journal of Aquatic Animal Health* 6: 310-317.
- Bustos P.A., Young N. D., Rozas M. A., Bohle H. M., Ildefonso R. S., Morrison R. N. & Nowak B. F. (2011). Amoebic gill disease (AGD) in Atlantic salmon (*Salmo salar*) farmed in Chile. *Aquaculture* 310: 281-288.
- Byrne P.J., Ferguson H.W., Lumsden J.S. & Ostland V.E. (1991). Blood chemistry of bacterial gill disease in brook trout *Salvelinus fontinalis*. *Diseases of Aquatic Organisms* 10: 1-6.

- Byrne P.J., Ostland V.E., Lumsden J.S., MacPhee D.D. & Ferguson H.W. (1995). Blood chemistry and acid-base balance in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* with experimentally-induced acute bacterial gill disease. *Fish Physiology and Biochemistry* 14: 509-518.
- Campbell T. & Murru F. (1999). Introduzione all' Ematologia dei Pesci. *Veterinaria, Anno 13* 6: 79-85.
- Castiglione E. (2009). Compendio Statistico del Settore Ittico. Roma. Edizioni ISMEA.
- Clark A. & Nowak B.F. (1999). Field investigations of amoebic gill disease in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in Tasmania. *Journal of Fish Diseases* 22: 433-443.
- Costanzi C. (2007). Risanamento degli allevamenti di trote dalla necrosi ematopoietica infettiva (NEI) e dalla setticemia emorragica virale (SEV). Tecniche di allevamento e trasformazione della trota. Ed. G. Baruchelli. San Michele all'Adige, Trento. Edizioni IASMA. pp. 357-368.
- D'Agaro E. (2007). L'alimentazione della trota. Tecniche di allevamento e trasformazione della trota. Ed. G. Baruchelli. San Michele all'Adige, Trento. Edizioni IASMA. pp. 165-172.
- Daoust P.Y. & Ferguson W.(1983). Gill diseases of cultured salmonids in Ontario *Canadian Journal of Comparative Medicine* 47: 358-362.
- Daoust P.Y. & Ferguson W.(1985). Nodular Gill Disease - A unique form Of Proliferative Gill Disease in rainbow-trout, *Salmo-gairdneri* Richardson. *Journal of Fish Diseases* 8: 511-522.
- Daoust P.Y.& Ferguson W. (1986). Potential for recovery in Nodular Gill Disease of rainbow-trout, *Salmo-gairdneri* Richardson. *Journal of Fish Diseases* 9: 313-318.
- Davison W. & Franklin C.E. (2003). Hypertension in *Pagothenia borchgrevinki* caused by X-cell disease. *Journal of Fish Biology* 63: 129-136.
- Del Cerro A., Mendoza M.C. & Guijarro J.A. (2002). Usefulness of a TaqMan-based polymerase chain reaction assay for the detection of the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *Journal of Applied Microbiology* 93: 149-156.
- Douglas-Helders M., Saksida S., Raverty S. & Nowak B.F. (2001). Temperature as a risk factor for outbreaks of Amoebic Gill Disease in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 21: 114-116.

- Dyková I., Figueras A. & Novoa B. (1995). Amebic gill infection of turbot, *Scophthalmus maximus*. *Folia Parasitologica* 41: 91-96.
- Dyková I., Figueras A. & Peric Z. (2000). *Neoparamoeba* Page, 1987: light and electron microscopic observations on six strains of different origin. *Diseases of Aquatic Organisms* 43: 217-223.
- Dyková I., Kostka M., Wortberg F., Nardy E. & Peckova H.(2010). New data on aetiology of nodular gill disease in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Folia Parasitologica* 57: 157-163.
- Dykova I. & Lom J.(2004). Advances in the knowledge of amphizoic amoebae infecting fish. *Folia Parasitologica* 51: 81-97.
- Dyková I. & Novoa B. (2001). Comments on diagnosis of amoebic gill disease (AGD) in turbot, *Scophthalmus maximus*. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 21: 40-44.
- Dyková I., Nowak B.F., Crosbie P.B.B., Fiala I., Peckova H., Adams M.B., Machackova B. & Dvorakova H. (2005). *Neoparamoeba branchiphila* n. sp., and related species of the genus *Neoparamoeba* Page, 1987: morphological and molecular characterization of selected strains. *Journal of Fish Diseases* 28: 49-64.
- Dyková I. & Tysl T. (2015). Testate amoeba *Rhogostoma minus* Belar, 1921, associated with Nodular Gill Disease of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases* On line. Doi 10.1111/jfd 12384.
- Ewing M.S, Black M.C., Blazer V.S. & Kocan K.M. (1994). Plasma Chloride and Gill Epithelial Response of Channel Catfish to Infection with *Ichthyophthirius multifiliis*. *Journal of aquatic Animal Health* 6: 187-196.
- Fabris A. (2012). La trota iridea, situazione attuale e prospettive a livello nazionale ed internazionale. Workshop Sostenibilità, Sanità, Qualità, e Sicurezza Alimentare nella Filiera Trota Iridea. in: Atti del XVIII Convegno Nazionale SIPI 9-11 maggio 2012 Udine. p.59.
- Fadaeifard F. & Azizi S. (2014). Histopathological evaluation of environmental gill disease (EGD) in the cultured rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *European Journal of Experimental Biology* 4: 390-394.
- FAO. (2013). Global Aquaculture Production (Fishstat). data.fao.org

- FEAP. (2014). European Aquaculture Production Report 2004-2013. Ed. Dehasque M. p.53.
- Ferguson H.W. (1989). Systemic pathology of fish: a text and atlas of comparative tissue responses in diseases of teleosts. Ames, Iowa, USA. Edizioni Iowa State University Press. p. 263.
- Ferguson H.W., Girons A., Rizgalla G., Lapatra S., Branson E.J., Mackenzie K., Davies M., Collins R.O., Diab A. & Crumlish M. (2006). Strawberry disease in rainbow trout in Scotland: pathology and association with *Flavobacterium psychrophilum*. *Journal of British Veterinary Association* 158: 630-632.
- Fernandes M.N. & Mazon A. de F. (2003). Environmental pollution and fish gill morphology. Fish Adaptations. Ed. A.L. Val & B.G. Kapoor. Edizioni Science Publisher Inc. Enfield, New Hampshire, USA. pp. 203-231.
- Findlay V.L. & Munday B.L (1998). Further studies on acquired resistance to amoebic gill disease (AGD) in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of fish diseases* 21: 121-125.
- Fioravanti M.L. & Caffara M. (2007). Le principali malattie parassitarie dei salmonidi allevati in italia. Tecniche di allevamento e trasformazione della trota. Ed. G. Baruchelli. San Michele all'Adige, Trento. Edizioni IASMA. pp. 327-356.
- Fisk D.M., Powell M.D. & Nowak B.F. (2002). The Effect of Amoebic Gill Disease and Hypoxia on Survival and Metabolic Rate of Atlantic Salmon (*Salmo salar*). *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 22: 190-194.
- Foster C. & Percival S. (1988a). Treatment of paramoebic gill disease in salmon and trout. *Saltas Acquanoote* No. 14, May 1988. Dover, Tasmania.
- Foster C. & Percival S. (1988b). Paramoebic gill disease. Occurrence of Paramoeba in Tasmania. *Saltas Acquanoote* No. 15, May 1988. Dover Tasmania.
- Franklin C.E., McKenzie J.C., Davison W. & Carey P.W. (1993). X-cell gill disease obliterates the lamellar blood supply in the Antarctic teleost, *Pagothenia borchgrevinki* (Boulenger, 1902). *Journal of Fish Diseases* 16: 249-254
- Ghittino C. & Pedroni A. (2007). Principali patologie batteriche nei salmonidi: diagnosi terapia e prevenzione. Tecniche di allevamento e trasformazione della trota. Ed. G. Baruchelli. San Michele all'Adige, Trento. Edizioni IASMA. pp. 271-284.

- Ghittino P. (1967). Eziologia e lesioni anatomo-patologiche della Malattia Branchiale (MB) delle trotelline in Italia. *Rivista Italiana di Piscicoltura e Ittiopatologia* 2: 24-29.
- Ghittino P. (1985). Tecnologia e Patologia in Acquacoltura, Vol 2° Patologia. Torino. Edizioni E. Bono. p. 444.
- Groman D.B. (1982). Respiratory System. Hystology of the Striped Bass. Bethesda, Maryland. Edizioni American Fisheries Society. pp. 40-46.
- Hoffmann R.W., El-Matbouli M. & Fisher-Scherl T. (1992). A proliferative gill disease (PGD) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 12: 139-141.
- Hughes G.M. & Nyholm K. (1979). Ventilation in rainbow trout (*Salmo gairdneri*, Richardson) with damaged gills. *Journal of Fish Biology* 14: 285-288.
- Iandoli C. & Trincanato A. (2007). Quadro Generale dell'Acquacoltura Italiana. Roma. Edizioni ISPRA. p. 56.
- Jensen H.M. (1963). Preparation of tissue cultures for virus research. *Bulletin Office International Des Épizooties* 59: 131-134.
- Jensen H.M. (1965). Research on the Virus Egtved Disease. *Annals of the New York Academy of Sciences* 125: 422-426.
- Kent M.L., Sawyer T.K. & Hendrick R.P. (1988). *Paramoeba pemaquidensis* (Sarcomastigophora: Paramoecidae) infestation of the gills of coho salmon *Oncorhynchus kisutch* reared in sea water. *Diseases of Aquatic Organisms* 5: 163-169.
- Lanari D. (2007). Areazione ed ossigenazione negli impianti di acquacoltura. Tecniche di allevamento e trasformazione della trota. G. Baruchelli. San Michele all'Adige, Trento. Edizioni IASMA. pp.71-116.
- Lanari D., D'Agaro E. & Ballestrazzi R. (1995). Effect of dietary DPIDE ratio on apparent digestibility, growth and nitrogen and phosphorus retention in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture Nutrition* 1: 105-110.
- Leef M.J., Harris J.O. & Powell M.D. (2005). Respiratory pathogenesis of amoebic gill disease (AGD) in experimentally infected Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Diseases of Aquatic Organisms* 66: 205-213.

- Lovy J., Becker J.A., Speare D.J., Wadowska D.W., Wright G.M & Powell M.D. (2007). Ultrastructural Examination of the Host Cellular Response in the Gills of Atlantic Salmon, *Salmo salar*, with Amoebic Gill Disease. *Veterinary Pathology* 44: 663-671.
- Mallat J. (1985). Fish gills structural changes induced by toxicants and other irritants: a statistical review. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 42: 630-648.
- Malte H. & Weber R.E. (1985). A mathematical model for gas exchange in the fish gill based on non-linear blood gas equilibrium curves. *Respiratory Physiology* 62: 359-374.
- Manzoni P. & Tepedino V. (2008). Salmonidae. Grande Enciclopedia Illustrata dei Pesci. Trebbo di Reno, Bologna. Edizioni Eurofishmarket S.r.l. pp. 387-400.
- Michel C., Bernardet J., Daniel P., Chilmonczyk S., Urdaci, M. & De Kinkelin, P. (2002). Clinical and aetiological aspects of a summer enteritic syndrome associated with the sporulating segmented filamentous bacterium '*Candidatus Arthromitus*' in farmed rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases* 25: 533-543
- Mouton A., Crosbie P., Cadoret K. & Nowak B. (2014). First record of amoebic gill disease caused by *Neoparamoeba perurans* in South Africa. *Journal of Fish Diseases* 37: 407-409.
- Munday B.L. (1986). Diseases of salmonids. In: *Proceedings of the Workshop on Diseases of Australian Fish and Shellfish* (ed. By J.D. Humphrey & J.S Langdon). Department of Agriculture and Rural Affairs, Benalla, Victoria. pp. 127-141.
- Munday B.L., Foster C.K., Roubal F.R. & Lester R.J.G. (1990). Paramoebic gill infection and associated pathology of atlantic salmon, *Salmo-salar*, and rainbow-trout, *Salmo-gairdneri*, in Tasmania. *Pathology in Marine Science* 1: 215-222.
- Munday B.L. & Jaisankar C. (1998). Postmortem changes in the gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in freshwater and seawater. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 18: 127-131.
- Munday B.L., Zilberg D. & Findlay V. (2001). Gill disease of marine fish caused by infection with *Neoparamoeba pemaquidensis*. *Journal of Fish Diseases* 24: 497-507.
- Noble A.C., Herman R.L., Noga E.J. & Bullock G.L. (1997). Recurrent amoebic gill infestation in rainbow trout cultured in a semiclosed water recirculation system. *Journal of Aquatic Animal Health* 9: 64-69.

- Noble A.C. & Summerfelt S.T. (1996). Diseases encountered in rainbow trout cultured in recirculating systems. *Annual Review of Fish Diseases* 6: 65-92.
- Nowak B.F., Carson J., Powell M.D. & Dyková I. (2002). Amoebic Gill Disease in the marine environment. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 22: 144-147.
- Nowak B.F. & Clark A. (1999). Prevalence of epitheliocystis in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., farmed in Tasmania, Australia. *Journal of Fish Diseases* 22: 73-78.
- Palmerr R., Carson J., Rutledge M., Drinan E. & Wagner T. (1997). Gill disease associated with *Paramoeba*, in sea reared Atlantic salmon in Ireland. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 17: 112-114.
- Powell M.D. (2007). Respiration in Infectious and Non-Infectious Gill Disease. Fish respiration and Environment. ed. Fernandes M.N., Rantin F.T., Glass M.L. & Kapoor B.G. Boca Raton, Florida, USA. Edizioni CRC Press. pp. 317-339.
- Powell M.D., Carson J. & Van Gelderen R. (2004). Experimental induction of gill disease in Atlantic salmon *Salmo salar* smolths with *Tenacibaculum maritimum*. *Diseases of Aquatic Organisms* 61: 179-185.
- Powell M.D. & Clark G.A. (2004). Efficacy and toxicity of oxidative disinfectants for the removal of gill amoebae from the gills of amoebic gill disease affected Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in freshwater. *Aquaculture Research* 35: 112-123.
- Powell M.D., Fisk D. & Nowak B.F. (2000). Effects of graded hypoxia on Atlantic salmon infected with amoebic gill disease. *Journal of Fish Biology* 57: 1047-1057.
- Powell M.D., Haman F., Wright G.M. & Perry S.F. (1998). Respiratory responses to graded hypoxia of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following repeated intermittent exposure to chloramine-T. *Aquaculture* 165: 27-39.
- Powell M. & Harris J.O. (2004). Influence of oxygen on the toxicity of chloramine-T to Atlantic salmon smolts in freshwater and seawater. *Journal of Aquatic Animal Health* 16: 83-92.
- Powell M.D., Harris J.O., Carson J. & Hill J.V. (2005). Effects of gill abrasion and experimental infection with *Tenacibaculum maritimum* on the respiratory physiology of Atlantic salmon *Salmo salar* affected by amoebic gill disease. *Diseases of aquatic organisms* 63: 169-174.

- Powell M.D. & Nowak B.F. (2003). Acid base and respiratory effects of confinement in Atlantic salmon affected with amoebic gill disease. *Journal of Fish Biology* 62: 51-63.
- Powell M.D. & Perry S.F. (1997). Respiratory and acid-base disturbances in rainbow trout blood during exposure to chloramine-T under hypoxia and hyperoxia. *Journal of Fish Biology* 50: 418-428.
- Powell M.D. & Perry S.F. (1998). Acid-base and ionic fluxes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during exposure to chloramine-T. *Aquatic Toxicology* 43: 13-24.
- Powell M.D. & Perry S.F. (1999). Cardio-respiratory effects of chloramine-T exposure in rainbow trout. *Experimental Biology Online* 4: 1-59.
- Powell M.D., Speare D.J. & Becker J.A. (2006). Whole body net ion fluxes, plasma electrolyte concentrations and hematology during a *Loma salmonae* infection in juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Disease* 73: 154-165.
- Powell M.D., Wright G.M. & Speare D.J. (1995). Morphological changes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) gill epithelia following repeated intermittent exposure to chloramine-T. *Canadian Journal of Zoology* 73: 154-165.
- Randall D.J. & Wright P.W. (1989). The interaction between carbon dioxide and ammonia excretion and water pH in fish. *Canadian Journal of Zoology* 67: 2936-2942.
- Roberts R.J. (1990). Anatomia e fisiologia dei pesci, ed G. Giorgetti, Bologna. Edizioni Agricole della Calderini S.r.l. pp. 12-46.
- Roberts S.D. & Powell M.D. (2003). Comparative ionic flux and gill mucous cell histochemistry: effects of salinity and disease status in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Comparative Biochemistry and Physiology* 134: 525-537.
- Roberts S.D. & Powell M.D. (2005). Erratum: The viscosity and glycoprotein biochemistry of salmonid mucus varies with species, salinity and the presence of amoebic gill disease. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology* 175: 1-11.
- Rodger H.D. & McArdle J.F. (1996). An outbreak of amoebic gill disease in Ireland. *Veterinary Record* 139: 348-349.

- Rucker R.R. & Kangas P.M. (1974). Effect of nitrogen supersaturated water on coho and chinook salmon. *Program of Fish Culture* 83: 297-312.
- Saroglia M. & Terova G. (2007). Controlli di alcuni importanti parametri di qualità dell'acqua negli allevamenti intensivi. Tecniche di allevamento e trasformazione della trota. Ed. G. Baruchelli. San Michele all'Adige, Trento. Edizioni IASMA. pp. 51-70.
- Sarti M. (2000). Evoluzione dell'allevamento e del mercato della trota in Italia. *Il Pesce* 3: 41-43.
- Scott J.E. (1989). Ion binding patterns of affinity depending upon type of acid groups. In: *Mucus and Related Topics*. E. Chantler and N.A. Ratcliffe (eds.). The Company of Biologists Ltd. Cambridge, UK. pp. 111-115.
- Speare D.J. (1999). Nodular gill disease (amoebic gill infestation) in Arctic char, *Salvelinus alpinus*. *Journal of Comparative Pathology* 121: 277-282.
- Speare D.J. & Ferguson H.W. (1989). Fixation artefacts in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) gills: a morphometric evaluation. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 46: 780-785.
- Steinum T., Kvellestad A., Rønneberg L.B., Nilsen H., Asheim A., Fjell K., Nygård S. M. R., Olsen A. B., Dale O. B. (2008). First cases of amoebic gill disease (AGD) in Norwegian seawater farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L., and phylogeny of the causative amoeba using 18S cDNA sequences. *Journal of Fish Disease* 31: 205-214.
- Taylor R.S., Muller W.J., Cook M.T., Kube P.D. & Elliott N.G. (2009). Gill observations in Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.) during repeated amoebic gill disease (AGD) field exposure and survival challenge. *Aquaculture* 290: 1-8.
- Taylor R.S., Wynne J.W, Kube P.D. & Elliot N.G.(2007). Genetic variation of resistance to amoebic gill disease in Atlantic salmon (*Salmo salar*) assessed in a challenge system. *Aquaculture* 272: 94-99.
- Tubbs L., Wybourne B.A. & Lumsden J.S. (2010). Nodular gill disease causing proliferative branchitis and mortality in Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *New Zealand veterinary journal* 58: 59-61.
- Ultsch G. & Gros G. (1979). Mucus as a diffusion barrier to oxygen: possible role in O₂ uptake at low pH in carp (*Cyprinus carpio*) gills. *Comparative Biochemistry and Physiology* . 62 A, 685-689.

- Urdaci M.C., Chakroun C., Faure D. & Bernardet J.F. (1998). Development of a polymerase chain reaction assay for identification and detection of the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *Research in Microbiology* 149: 519-530.
- Van Winkle W., Coutant C.C., Jager H.I., Mattice J.S., Orth D.J., Otto R.G., Railsback S.F. & Sale M.J. (1997). Effects of climatic temperature change on growth, survival, and reproduction of rainbow trout: predictions from a simulation model. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 54: 2526-2542.
- Verner-Jeffreys D., Pond M.J., Peeler E.J., Rimmer G.S.E., Oidtmann B., Way K., Mewett J., Jeffrey K., Bateman K., Reese R.A. & Feist S.W. (2008). Emergence of cold water strawberry disease of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* in England and Wales: Outbreak investigations and transmission studies. *Diseases of aquatic organisms* 79: 207-218.
- Wagner E.J., Bosakowski T. & Intelmann S. (1997) Combined effects of temperature and high pH on mortality and the stress response of rainbow trout after stocking. *Transactions of the American Fisheries Society* 126: 985-998.
- Weitkamp D.E. & Katz. M. (1980) A review of dissolved gas supersaturation literature. *Transactions of the American Fisheries Society* 109: 659-702.
- Weston J.H., Welsh M.D., McLoughlin M.F. & Todd D. (1999) Salmon pancreas disease virus, an alphavirus infecting farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Virology* 256: 188-195.
- Young N.D., Crosbie P.B.B., Adams M.B., Nowak B.F. & Morrison R.N. (2007) *Neoparamoeba perurans* n. sp., an agent of amoebic gill disease of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *International Journal for Parasitology* 37: 1469-1481.
- Young N.D., Dykova I., Nowak B.F. & Morrison R.N. (2008) Development of a diagnostic PCR to detect *Neoparamoeba perurans*, agent of amoebic gill disease. *Journal of Fish Diseases* 31: 285-295.
- Zilberg D., Gross A. & Munday B.L. (2001) Production of salmonid amoebic gill disease by exposure to *Paramoeba* sp. harvested from the gills of infected fish. *Journal of Fish Diseases* 24: 79-82.

RINGRAZIAMENTI

Grazie a:

Il mio relatore Prof. Francesco Quaglio ed il mio correlatore Dottor Paolo Bronzatti, per la loro disponibilità durante lo svolgimento della tesi e per avermi introdotto nel mondo dell'acquacoltura.

I tecnici del laboratorio di Anatomia Patologica: Enrico, Rossella e Davide, per avermi sempre aiutato nel lavoro e per la loro simpatia che ha reso l'attività di laboratorio uno dei momenti più belli della tesi.

La Prof.ssa Maria Letizia Fioravanti ed il Dottor Andrea Gustinelli, per il prezioso lavoro che hanno svolto nella ricerca.

Il Dottor Amedeo Manfrin e i ricercatori dell'istituto Zooprofilattico delle Venezie sede di Adria, per la loro disponibilità e per il loro contributo.

La mia famiglia, per aver sempre creduto in me durante questi anni, sostenendomi sempre.

Le componenti del trio: Elena e Maria Giulia, pronte a rimettermi in sesto dopo ogni disavventura.

Sara, per essermi sempre stata vicino in ogni momento.

Luca, l'amicone indelebile sperduto dall'altra parte del mondo.

Emma, la mia fidata commilitona universitaria compagna di mille battaglie.

Desidero infine ringraziare tutti i miei amici, di Verona e di Padova, con i quali ho vissuto mille avventure. Vorrei citarvi tutti quanti, ma, ahimè, credo di avere un limite di pagine...

Grazie a tutti voi...

ora vado avanti...