



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

**L' ATTIVITÀ DI RICERCA CORRENTE PRESSO L'IZS LAZIO E TOSCANA:
principali risultati e loro trasferibilità operativa
Roma, 19 giugno**

Sorveglianza sanitaria in pesci autoctoni ed ornamentali : valutazione epidemiologica del rischio nel Lazio

Teresa Bossù



Introduzione

Recente introduzione di Koi Herpes Virus (*CyHV-3*) nella fauna selvatica, similmente a quanto avvenuto con il *CyHV-2* (**Fichi et al, 2013**) un chiaro esempio del **rischio connesso alla movimentazione** di soggetti non sottoposti a controlli sanitari, per *CyHV-3* è stata proposta proprio la commercializzazione di specie ornamentali (carpe Koi) come principale fonte di diffusione della malattia nel mondo (**El- Matbouli et al., 2011**).

Rischio zoonosico per gli operatori del settore e per i privati che gestiscono pesci ornamentali (**Eur J Dermatol. Bonamonte et al, 2013**).





Introduzione

Nel 2003, in Italia, si sono verificati i primi 2 casi di opisthorchiasi nell'uomo, ospedalizzati presso l'azienda ospedaliera di Perugia, per consumo di pesce crudo (**Tinca**) pescato nel lago Trasimeno. Dal 2006 ad oggi sono stati diagnosticati **186 casi** di cui la maggior parte focolai epidemici per consumo di pesce crudo in ristoranti o manifestazioni gastronomiche. Ad oggi in Italia *O. felineus* sembra essere localizzato nei laghi di Bracciano, Bolsena e Vico, dove sono stati indagati tutti gli aspetti del ciclo biologico del parassita.



Obiettivi

- Indagare sulla presenza di *Opisthorchis felineus* nei ciprinidi in alcuni laghi della provincia di Rieti ove insistono attività di pesca professionale (lago del Salto e del Turano) e nel lago di Martignano Ampliare i dati epidemiologici sul lago di Vico
- Rilevare le condizioni sanitarie attuali relative alle partite di pesci ornamentali di acqua dolce ed acqua salata, importate da Paesi Terzi
- Raccogliere le informazioni su quantità e specie di pesci ornamentali importati nella regione Lazio



Materiali e metodi

Per la definizione numerica e metodologica del campionamento in via preliminare sono stati raccolti presso il Ministero della Salute i dati relativi alle importazioni di pesci ornamentali sia a livello nazionale che regionale.

È stata messa a punto una scheda di campionamento di pesci ornamentali presso le serre e i rivenditori



Materiali e metodi

- ✓ Esame necroscopico
- ✓ Esame parassitologico a fresco cute branchie e intestino
- ✓ Esame batteriologico cervello, rene e altro se presenti lesioni
- ✓ Esame istologico (se necessario)
- ✓ Esame virologico (colture cellulari, PCR, Microscopio elettronico)



Materiali e metodi

Opisthorchis felineus

- ✓ Schiacciamento del muscolo (M.O.)
- ✓ Digestione artificiale del muscolo
- ✓ Molluschi (ospite intermedio) PCR e sequenziamento



Risultati

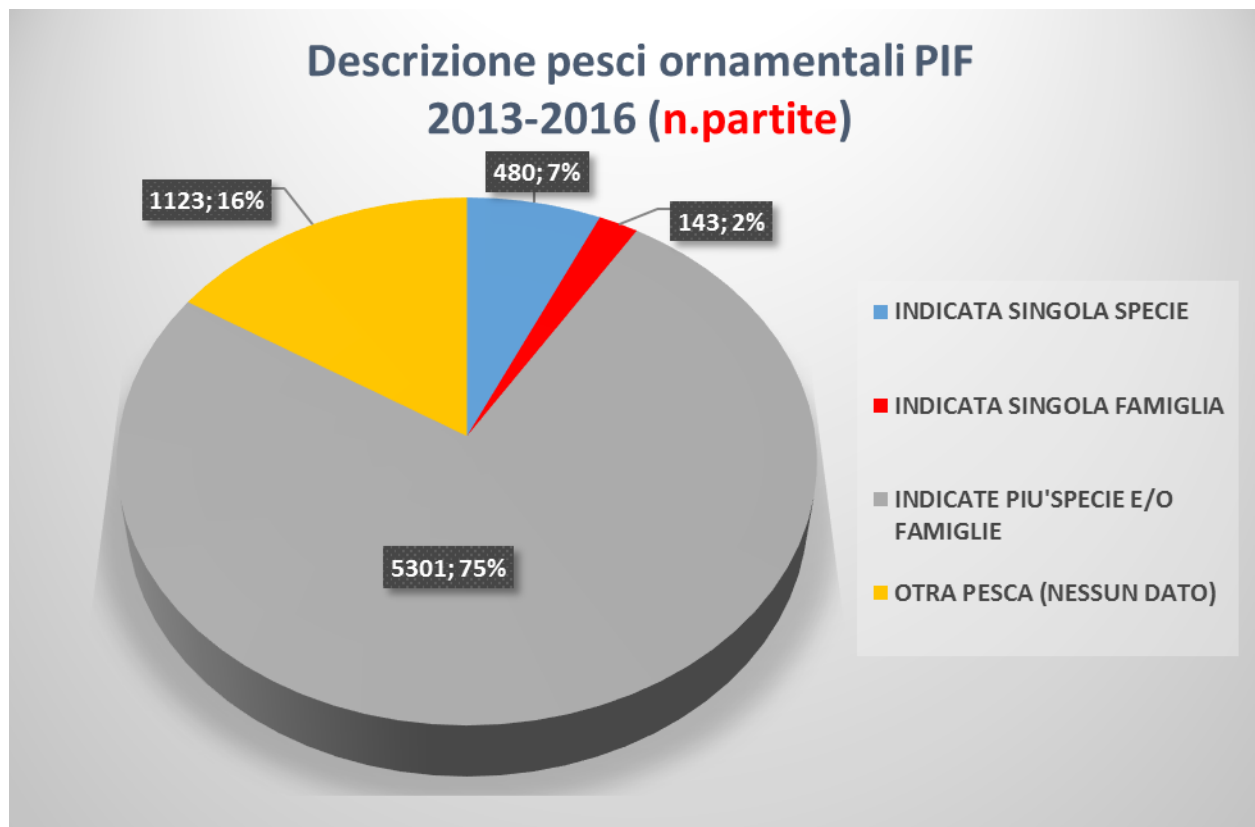
IMPORTAZIONI DA PAESI TERZI (P.I.F. COMUNITARI) VERSO IT di pesci ornamentali

PIF di arrivo	Numero di partite (2013-2016)
FRANCIA	1
Roissy Charles-De-Gaulle	1
GERMANIA	180
Frankfurt	173
München	7
ITALIA	6859
Milano – Malpensa, A	3062
Roma – Fiumicino, A	3797
OLANDA	1
Amsterdam, A	1
PORTOGALLO	3
Lisbona, A	3
SVIZZERA	3
Zurich Airport	3

Aeroporti di arrivo dei campioni provenienti da Paesi Terzi (PIF comunitari) verso Italia (anni 2013-2016).



Risultati



Numero di partite e distribuzione relativa pesci ornamentali provenienti dai Paesi Terzi (PIF comunitari) verso l'Italia (anni 2013-2016).





CAMPO SPECIE		N.
Amsterdam, A		1
INDICATA SINGOLA SPECIE		1
Frankfurt/Main		173
DATO SPECIE O FAMIGLIA NON DISPONIBILE		27
INDICATA SINGOLA FAMIGLIA		58
INDICATA SINGOLA SPECIE		36
INDICATE PIU' SPECIE E/O FAMIGLIE		52
Lisboa, A		3
INDICATE PIU' SPECIE E/O FAMIGLIE		3
Milano - Malpensa, A		3062
DATO SPECIE O FAMIGLIA NON DISPONIBILE		411
INDICATA SINGOLA FAMIGLIA		46
INDICATA SINGOLA SPECIE		177
INDICATE PIU' SPECIE E/O FAMIGLIE		2428
München		7
INDICATA SINGOLA FAMIGLIA		1
INDICATA SINGOLA SPECIE		5
INDICATE PIU' SPECIE E/O FAMIGLIE		1
Roissy Charles-De-Gaulle		1
INDICATE PIU' SPECIE E/O FAMIGLIE		1
Roma - Fiumicino, A		3797
DATO SPECIE O FAMIGLIA NON DISPONIBILE		685
INDICATA SINGOLA FAMIGLIA		37
INDICATA SINGOLA SPECIE		261
INDICATE PIU' SPECIE E/O FAMIGLIE		2814
Zurich Airport		3
INDICATA SINGOLA FAMIGLIA		1
INDICATE PIU' SPECIE E/O FAMIGLIE		2
Totale complessivo		7047

Dettaglio numero di partite relativa pesci ornamentali provenienti dai Paesi Terzi (PIF comunitari) verso l'Italia (anni 2013-2016).



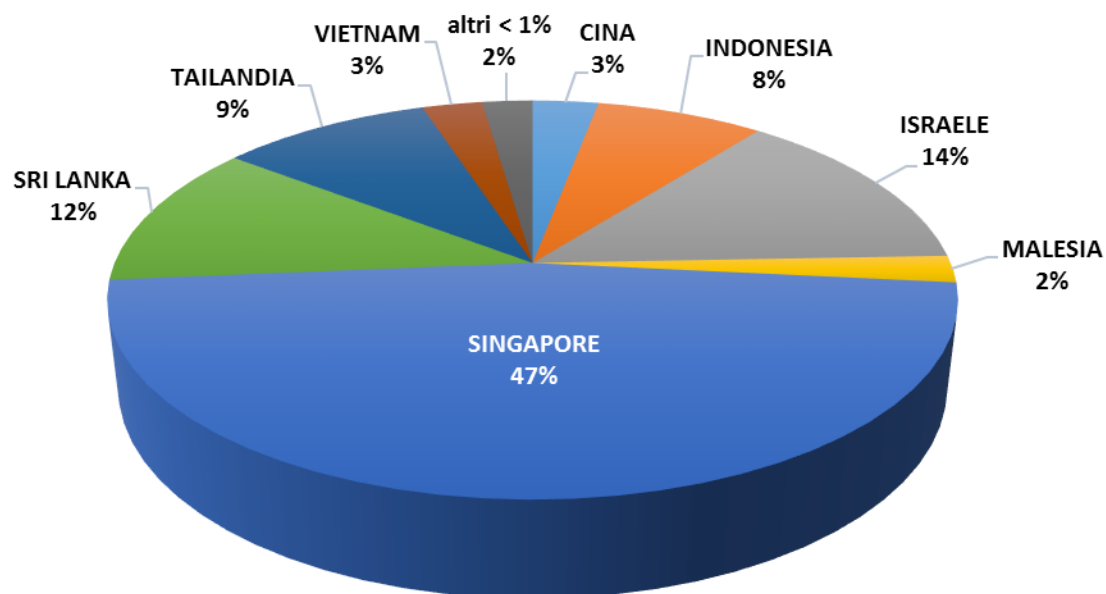


È stato aggiunto il campo famiglia ai record (partite) costituite da poche specie appartenenti alla stessa famiglia. I record costituiti da più specie appartenenti a differenti famiglie, sono stati codificati come “MIX”. In questi record (n=5299) sono indicate molteplici specie o/e famiglia. Per “OTRA PESCA” si intendono invece le partite in cui non si hanno informazioni di specie o famiglia

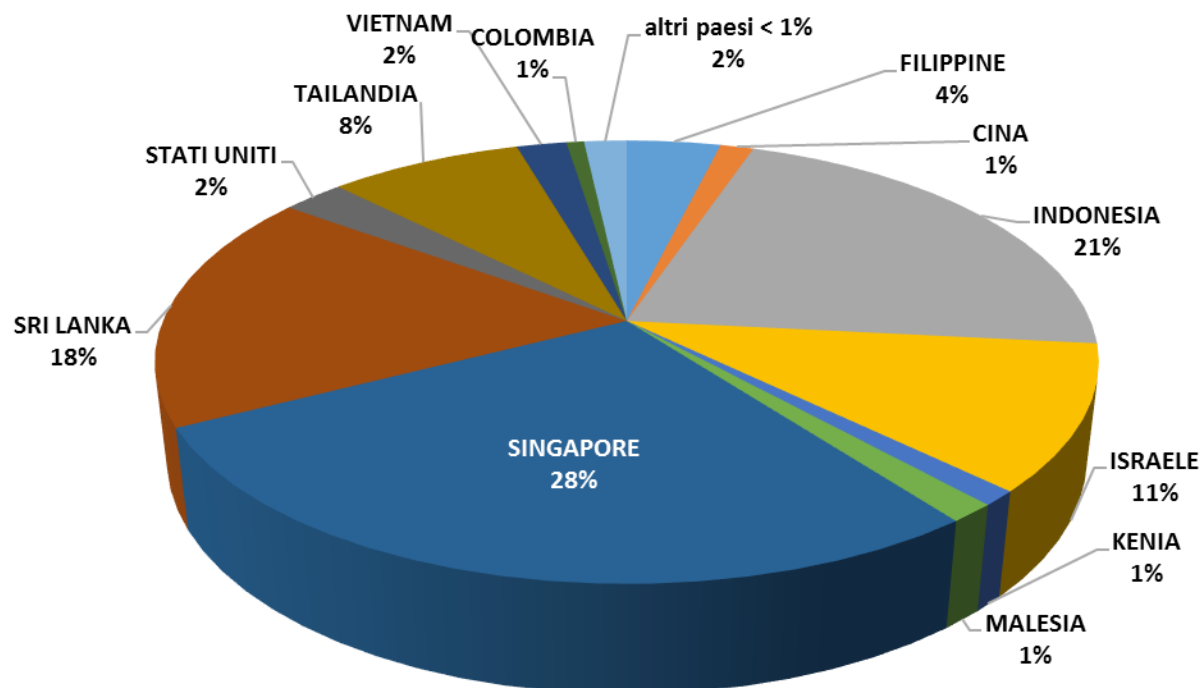
MIX (indicate più specie e/o famiglie nel singolo record, non scorporabile)	5299
OTRA PESCA (dato specie o famiglia non disponibile)	1123
TOTALE COMPLESSIVO	7047



Provenienza importazioni pesci ornamentali 2013 - 2016 (n. animali)



Provenienza importazioni pesci ornamentali 2013 - 2016 (n. partite)





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

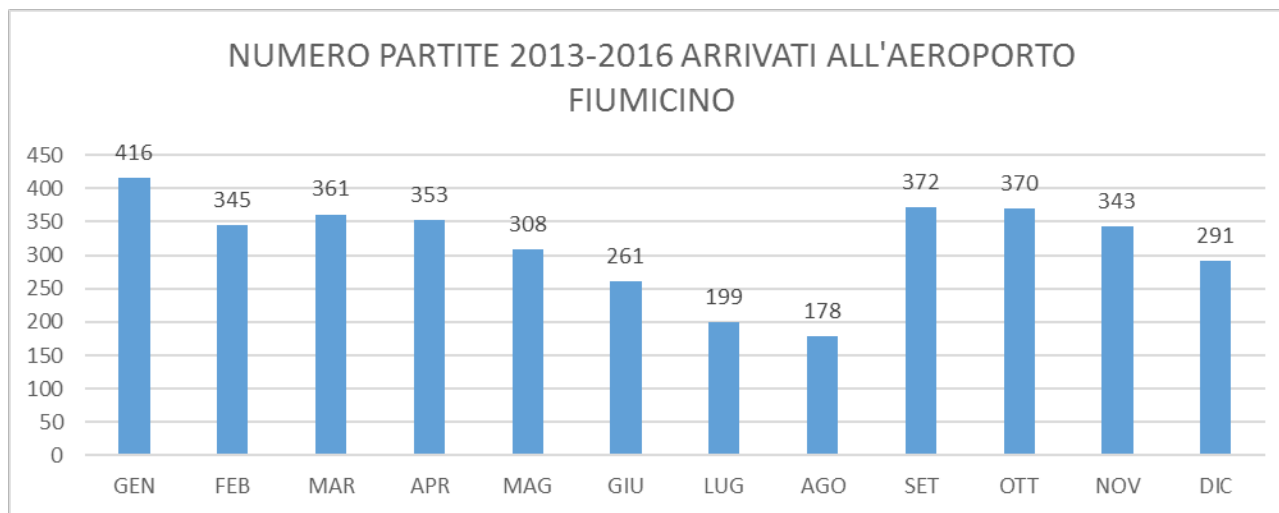
DATI PIF LAZIO

PARTITE PIF	GEN	FEB	MAR	APR	MAG	GIU	LUG	AGO	SET	OTT	NOV	DIC	Totale
Roma - Fiumicino, A - TOTALE	416	345	361	353	308	261	199	178	372	370	343	291	3797
SINGAPORE	152	114	120	121	115	95	86	62	117	131	108	98	1319
INDONESIA	93	84	89	78	57	55	30	21	72	76	74	63	792
SRI LANKA	64	57	50	53	45	37	28	33	66	60	56	49	598
TAILANDIA	30	33	31	33	29	26	22	23	41	34	32	31	365
ISRAELE	27	15	29	20	18	19	9	14	22	22	21	14	230
VIETNAM	13	10	8	12	9	6	3	7	9	16	12	6	111
FILIPPINE	12	10	13	18	16	10	9	8	15	14	10	9	144
MALESIA	11	3	6	3	6	2	2	2	11	5	5	4	60
KENIA	5	4	5	2			2	1	1	3	5	4	32
STATI UNITI	5	9	4	6	7	9	5	5	8	5	9	8	80
CINA	3	5	2	3	2		1	1	4	3	5	3	32
MALDIVE	1	1	1	1	1	1	2		2		2		12
AUSTRALIA									1				1
BRASILE						1							1
CONGO R. DEM.									1				1
EGITTO												1	1
FIJI					1								1
GIAPPONE			3	2	1						4		10
PERU								1					1
TAIWAN				1	1				2	1		1	6





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

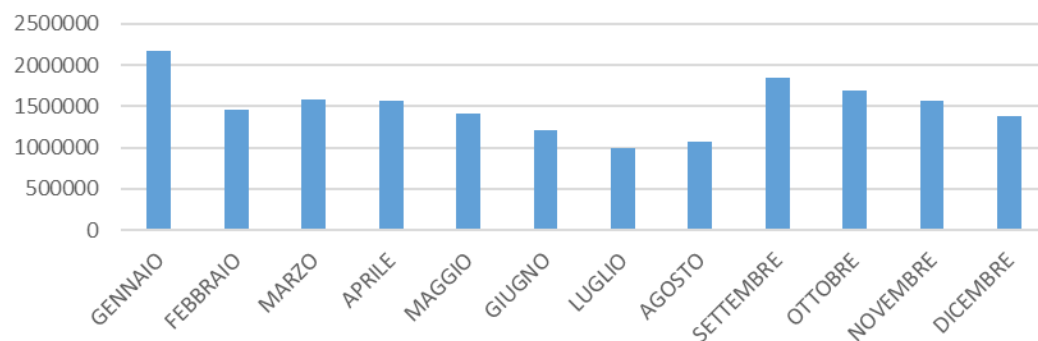




Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

Roma - Fiumicino, A	N. ANIMALI
TOTALE	17963021
SINGAPORE	10470856
TAILANDIA	2261762
SRI LANKA	1279825
INDONESIA	1272590
ISRAELE	966712
VIETNAM	680561
MALESIA	652012
CINA	187558
FILIPPINE	140659
STATI UNITI	19289
KENIA	15597
TAIWAN	5851
GIAPPONE	5150
MALDIVE	3021
PERU	928
CONGO R. DEM.	356
BRASILE	104
FIJI	101
EGITTO	82
AUSTRALIA	7

NUMERO ANIMALI 2013-2016 ARRIVATI
ALL'AEROPORTO DI FIUMICINO



COUNTRY OF ORIGIN: CZECH REPUBLIC

N°	SPECIES	KIDNEY	BRAIN	MYCOBACTERIA	HISTOLOGY	NECROPSY
2065	C. Paleatus	Negative	Negative	Negative	/	normal
2064/1	P. Scalare	<i>V. mimicus</i> <i>A. sobria</i>	Negative	Negative	/	normal
2064/2	P. Scalare	<i>V. mimicus</i> <i>P. shigelloides</i>	<i>A. sobria</i>	Negative	/	normal
2064/3	P. Scalare	<i>L. garviae</i> <i>V. mimicus</i>	<i>A. veronii</i>	Negative	/	normal
2063	P. Reticulata	Negative	Negative	Negative	/	exophthalmia/ skin ulcer
2062	C. Auratus	Negative	<i>A. veronii</i>	Negative	/	spinal deviation
2061	P. Scalare	Negative	<i>V. cholerae</i>	Negative	/	normal
2180	P. Reticulata(Water 1A)	<i>A. veronii</i>	Negative	Negative	/	normal
2181	P. Scalare(Water 2A)	<i>A. hydrophila</i>	Negative	Present	granulomas	Cerebral hyperemia
2182	P. Scalare(Water 3A)	<i>A. hydrophila</i>	Negative	Present	/	normal
2183	P. Scalare	Negative	Negative	Negative	/	normal
2184	C. Auratus	<i>A. hydrophila</i>	Negative	Negative	/	Natatory bladder inflation
2185	H. Serpae	Negative	Negative	Negative	/	normal
2186	H. Plecostomus	Negative	Negative	Negative	/	normal
2342	Koi carp	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>	Negative	/	Multiple skin ulcers
2342/1	Koi carp	<i>A. sobria</i>	<i>A. sobria</i>	Negative	/	Multiple skin ulcers





COUNTRY OF ORIGIN: SOUTH EAST ASIA

N°	SPECIES	KIDNEY	BRAIN	MYCOBACTERIA	HISTOLOGY	NECROPSY
2406	C. sterbai (water3A)	Negative	Negative	Negative	/	normal
2407	X. maculatus	Negative	Negative	Negative	/	normal
2408	P. reticulata	Negative	Negative	Present	/	normal
2411	P. imperator (water1A)	Negative	Negative	Present	/	normal
2410	C. paleatus (water 2A)	A. sobria	Negative	Absent	/	normal
2406	X. helleri	A. veronii	Negative	Present	/	normal





N°	TYPE	PSEUDOMONAS	OTHERS	ORIGIN
2069	Transportation	Aeruginosa	Negative	Czech Rep.
2068	Transportation	Aeruginosa	Negative	Czech Rep.
2067	Transportation	Aeruginosa	Negative	Czech Rep.
2066	Transportation	Aeruginosa	Negative	Czech Rep.
2070	System water	Negative	Negative	/
2071	Filtering media	Aeruginosa	Mycobacterium spp	/

N°	TYPE	VIBRIO	PSEUDOMONAS	AEROMONAS	OTHERS	ORIGIN
2194	Stocking 1A	Cholerae	Aeruginosa	Negative	Negative	/
2193	Stocking 2A	Cholerae	Aeruginosa	Negative	Negative	/
2192	Stocking 3A	Negative	Negative	Negative	Negative	/
2191	Transportation	Negative	Negative	Negative	S. gordonii	Czech Rep.
2190	Transportation	Negative	Aeruginosa	Hydrophila	Negative	Czech Rep.
2189	Transportation	Negative	Negative	Negative	Edwardsiella tarda	Czech Rep.
2188	Transportation	Negative	Negative	Veronii	Negative	Czech Rep.
2187	Transportation	Negative	Negative	Negative	S. fonticola	Czech Rep.





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

N°	TYPE	VIBRIO	PSEUDOMONAS	AEROMONAS
2401	Stocking 1A	Vulnificus	Putida	Negative
2402	Stocking 2A	Cholerae	Negative	Negative
2403	Stocking 3A	Negative	Negative	Veronii
2404	Stocking	Negative	Aeruginosa	Hydrophila
2405	Stocking	Negative	Negative	Negative





Al microscopio elettronico, sulle branchie di due soggetti di *Scleropages formosus* è stato evidenziato un Herpesvirus che però, purtroppo, non è stato possibile identificare (né con le nostre metodiche né presso il Centro di Referenza nazionale di Ittiopatologia di Legnaro (PD) a cui è stato inviato).

In totale, al microscopio elettronico a trasmissione sono stati osservati n. 16 campioni e n. 15 campioni sono stati inoculati su colture cellulari per un totale di n. 44 determinazioni analitiche





- n. 8 per ricerca Betanodavirus, di cui n.2 positivi (1 camp pool Acanthurus leucosternum e 1 camp. pool Tetradontidae).
- n. 28 per ricerca Herpesvirus dei Ciprinidi, di cui n.7 identificati come CyHV-2 (5 campioni Carassio auratus-; 1 campione carassio Black Moore-5, 1 campione carassio Chicco di riso)
- n. 61 per ricerca Herpesvirus della Carpa Koi (n.1 positivo, pool fegato 1-4)
- n. 34 per ricerca virus IHN, tutti negativi
- n. 34 per ricerca virus VHS, tutti negativi
- n. 30 per ricerca virus IPN, di cui n.2 positivi
- n. 92 per ricerca virus SVC, di cui n.3 positivi



Sequenziamenti

Per quanto riguarda il sequenziamento sono stati analizzati:

- a) gli amplificati della Nested PCR CyHV per 3 campioni di *Carassius auratus* (58008 pool *Carassius auratus*) e tutti hanno confermato la presenza del Cyprinid Herpesvirus 2 ceppo West Bengal, Accession Number KT900136.1, caratterizzato da una identità di sequenza del 99% e query-cover del 99%;
- b) gli amplificati della RT-Nested PCR per 2 campioni di *Coridoras* spp. (58008 pool *Coridoras* spp.) ed entrambi hanno confermato la presenza del virus SVCv caratterizzato da una identità del 96% e query-cover del 98% con la sequenza Accession Number Z37505.1



Ricerca di *Opisthorchis felineus*

Su un totale di 100 pesci prelevati presso i 4 laghi, solo 8 tinche (8/10) provenienti dal lago di Vico sono risultate positive per metacercarie di *O. felineus*

Un totale di 37 pool di molluschi appartenenti a diversi taxa (7 dal lago di Vico, 7 dal lago di Martignano, 13 dal lago del Salto, 10 dal lago del Turano) è stata analizzata mediante i diversi protocolli di PCR. Il DNA di *O. felineus* è stato rilevato in due campioni di molluschi, uno proveniente dal Lago di Vico, l'altro dal Lago del Salto





le sequenze ottenute dai molluschi, il pool
proveniente dal lago di Vico costituito da 13
individui è stato attribuito alla specie ***Physella***
acuta

mentre il campione proveniente dal Lago
del Salto è stato attribuito alla specie
Radix auricularia



Conclusioni

Non è possibile avere dati completi di specie in relazione alla provenienza: per incompletezza. Solo in pochi record (partite) è indicata la singola specie e il numero di animali. I dati relativi alle partite che arrivano da paesi europei comprendono partite che giungono e permangono presso grossisti europei, prima di essere venduti nei vari paesi, Italia compresa. Per queste partite viene perso il dato relativo al paese d'origine.

E' molto difficile determinare la reale prevalenza di batteri zoonosici e non, virus e parassiti.





La presenza di *O. felineus* nel Lago di Vico era già stata segnalata nelle tinche (*Tinca tinca*), secondo ospite intermedio di questo trematode (Pozio *et al.*, 2013). I risultati ottenuti durante questo studio costituiscono quindi una conferma del ciclo naturale del parassita in questo lago, mentre rappresentano la prima segnalazione di *O. felineus* nel Lago del Salto.

Di notevole interesse è inoltre l'attribuzione a diversi generi di gasteropodi quali ***Physella*** e ***Radix*** quali possibili primi ospiti intermedi di *O. felineus*.





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

GRAZIE PER L'ATTENZIONE

Livia Amoroso

Selene Marozzi

Sonia Amati

Cristiano Cocumelli

Claudio De Liberato

Paola Scaramozzino

Valentina Snallucci

Giusy Cardeti

Antonella Cersini

Silvia Puccica

Valeria Antognetti

Giampiero Dante

Stefania Sittinieri

Marina Cittadini

Federica Berrilli

Giuseppe Micarelli

Palazzetti

Enrica Martini

Carotti Stefano

Cocco Ampelio

Antonimi Giuseppe

Fabrizio Santini

Cristina Checcacci

Martinelli Chiara

Stefano Saccares

Roberto Condoleo

Ziad Mezher

Giuseppe Arcangeli

