

# CARATTERIZZAZIONE DI ALTERAZIONI SCHELETRICHE IN *Sparus aurata* D'ALLEVAMENTO. CONSIDERAZIONI ISPETTIVE

## CHARACTERISATION OF SKELETAL DEFORMITIES IN REARED *Sparus aurata*. INSPECTIVE CONSIDERATION

Panebianco A.<sup>1</sup>, Lo Presti A.<sup>2</sup>, Giarratana F.<sup>1</sup>, Donato G.<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>) Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria, Facoltà di Medicina Veterinaria - Università degli Studi di Messina

(<sup>2</sup>) Dottore in Medicina Veterinaria.

### SUMMARY

The authors characterise some modifications of rachis of reared Gilthead seabream by using the biometry and the TAC. They purpose, particularly, the use of the Dimensional Comparison Ratio (RCD), in order to quickly assess the degree of lesions. Furthermore, they found that the lesions are configurable as cases of bone rarefaction and conclude stressing the importance of the monitoring and recording of these lesions by the Food Business Operator at level of the primary production.

### Key words

*Sparus aurata*, gilthead seabream, skeletal deformities, hygiene of food of animal origin

### INTRODUZIONE

La presenza di malformazioni scheletriche, in particolare del rachide, nei pesci marini e d'acqua dolce è nota da tempo come reperto eccezionale nei selvatici e, più recentemente, con elevata incidenza anche in quelli allevati. Si tratta di lordosi, cifosi, scoliosi di varia entità spesso coesistenti nello stesso soggetto in cui anche le ossa craniche, l'osso mascellare superiore e quello inferiore possono, più raramente, presentare malformazioni. Detta elevata incidenza in acquacoltura suscita vivo interesse nei ricercatori per le numerose incertezze eziopatogenetiche e negli stessi produttori per l'ovvio deprezzamento dei pesci e lo scadimento d'immagine. Le maggiori incidenze che al momento si riscontrano nel pesce dei nostri mercati, riguardano l'orata e, in minor misura, la spigola, sia d'allevamento in vasca che off-shore.

Relativamente all'eziopatogenesi sono stati proposti i seguenti scenari: i) anomalie genetiche aggravate in acquacoltura dalla frequente consanguineità (1); ii) deficit o eccessi nutrizionali che eserciterebbero influenza, in particolare, sull'accrescimento delle larve e degli avannotti (diverse classi di fosfolipidi, acidi grassi insaturi, tirosina, isoleucina, valina, metionina, triptofano, vitamina A). Nei riproduttori, carenze di vitamina C, triptofano, fosfolipidi o vitamina D comporterebbero deformità scheletriche nella discendenza. Più in generale, gli stati carenziali e le conseguenti dismetabolie potrebbero determinare l'insorgenza di stati di acidosi con conseguente mobilizzazione di calcio scheletrico con alterato rimaneggiamento del tessuto osseo. Anche carenze o eccessi minerali potrebbero essere influenti (2, 3, 4, 5, 6). iii) Insulti tossici. Al di là di qualche farmaco come le tetracicline sospettate di avere un qualche ruolo, molto documentata è la responsabi-

lità di inquinanti ambientali quali diossine, composti policiclici aromatici, metalli pesanti in particolare piombo e cadmio, ma pure mercurio, rame e zinco ed ancora, interessanti, le segnalazioni su malformazioni di pesci esposti agli effetti teratogeni dello zinco pyrithione utilizzato nella composizione di shampoo anti-forfora (7). iv) Numerosi parassiti, con meccanismi diretti o indiretti, potrebbero essere influenti; ricordiamo alcuni *Mixosporidi*, trematodi Digenei, *Ichthyophonus hoferi*, Acantocefali ed altri ancora (8, 9). v) Molto interessanti, infine, i fattori fi-

sici, chimici o meccanici a partire dalla densità delle uova, agli shock termici, sovraffollamento con limitazione dell'attività di nuoto, variazioni dell'illuminazione e delle caratteristiche chimico-fisiche dell'acqua con conseguenti modificazioni dei ritmi circadiani, ecc.(10). La responsabilità di tali evenienze sarebbe, in ogni caso, verosimilmente relazionata allo stress cronico indotto che, come già prospettato da Pellegrini et al. (1984), comporterebbe maggior consumo delle riserve glicidiche, acidosi per tamponare la quale non sarebbe più sufficiente l'escre-

Tabella 1: elenco delle valutazioni morfometriche effettuate

Misura	Descrizione misura	Sigla
largh. interoculare	da una superficie corneale all'altra	OP
lunghezza cefalica	dalla punta del mascellare superiore al margine più caudale dell'opercolo	AM
lunghezza oro-nucle	dalla punta del mascellare superiore all'attaccatura del margine craniale della pinna dorsale	AB
altezza oculare	dal margine inferiore dell'occhio all'intersezione tra la verticale ed il margine inferiore del capo	VX
altezza cefalica ant.	da un margine all'altro del capo, verticalmente, davanti l'occhio	$\alpha\beta$
altezza cefalica post	da un margine all'altro del capo, verticalmente, dietro l'occhio	$\delta\gamma$
lunghezza oro-pettorale	dalla punta del mascellare superiore al margine più craniale della pinna pettorale	AN
lunghezza oro-ventrale	dalla punta del mascellare inferiore all'attaccatura del margine craniale della pinna ventrale	AD
lunghezza pinna dorsale	dall'attaccatura del margine anteriore all'attaccatura del margine posteriore della pinna dorsale	BE
lunghezza dorso-caudale	dal margine posteriore della pinna dorsale all'attaccatura della caudale	EF
lunghezza ventre-anale	dall'attaccatura del margine posteriore della pinna ventrale all'attaccatura del margine anteriore della ventrale	GH
lunghezza ano-caudale	dall'attaccatura del margine posteriore della pinna anale all'attaccatura della caudale	IJ
lunghezza pinna anale	dall'attaccatura del margine anteriore all'attaccatura del margine posteriore della pinna anale	HI
lunghezza totale	dalla punta del mascellare superiore al punto più craniale del margine posteriore della pinna caudale	AC
altezza anteriore	perpendicolarmente dall'attaccatura del margine anteriore della pinna dorsale	BK
altezza posteriore	perpendicolarmente dall'attaccatura del margine posteriore della pinna dorsale	EL
larghezza anteriore	dalla linea laterale destra alla sinistra, alla perpendicolare dall'attaccatura del margine anteriore della pinna dorsale	QR
larghezza posteriore	dalla linea laterale destra alla sinistra, alla perpendicolare dall'attaccatura del margine posteriore della pinna dorsale	ST
regressione oculare	dal margine anteriore dell'occhio orizzontalmente al profilo del capo	UV
primo segmento	dalla punta del mascellare superiore all'intersezione virtuale tra AC e BK	AY
secondo segmento	dall'intersezione virtuale tra AC e BK all'intersezione virtuale tra AC ed EL	YZ
terzo segmento	dall'intersezione virtuale tra AC ed EL al punto più craniale del margine posteriore della pinna caudale	ZC

zione di ioni H<sup>+</sup> delle cellule a cloruro ma, come prima già ricordato, si verificherebbe una mobilitazione del calcio osseo.

Sotto il profilo della sicurezza alimentare, se si escludono le osservazioni di Panebianco e Minniti (1993) relative ad orate con gravi malformazioni scheletriche, ricca contaminazione batterica e presenza di residui inibenti nel fegato, non emergerebbero immediati motivi di preoccupazione. Tuttavia, l'interesse igienistico e la necessità di approfondimenti ci sembrano oltremodo necessari considerate alcune delle possibilità eziopatogenetiche già espresse, in particolare quelle relative agli insulti tossici e agli stressori cronici che, notoriamente, possono compromettere la qualità igienico-sanitaria dei pesci. Ci sembra, dunque, che tale problematica riguardi appieno il Regolamento CE 852/2004, laddove vengono previsti gli obblighi per la produzione primaria segnatamente quelli relativi alla registrazione di ...*“insorgenza di malattie che possono incidere sulla sicurezza dei prodotti...”*.

In quest'ottica abbiamo ritenuto interessante procedere ad una caratterizzazione più approfondita dei quadri di deformità del rachide di orate di maricoltura.

## MATERIALI E METODI

L'indagine è stata condotta su n. 23 esemplari di *Sparus aurata* d'allevamento off-shore: 18 di essi sono stati sottoposti ad attenta valutazione morfometrica, sulla base delle misurazioni di cui alla Tabella 1, e successivamente calcolato gli indici di cui alla Tabella 2. Di questi, n. 5 soggetti unitamente ad altri 5 esemplari (non sottoposti a valutazione morfometrica) sono stati oggetto di Tomografia Assiale Computerizzata (TAC). Questa, effettuata in particolare su cinque pesci interi e su 5 rachidi scarificati, veniva eseguita con sistema monobanco Philips CT Aura. L'esame è stato eseguito con scannografia laterale e frontale con FOV pari a 120 mm.

Tabella 2: indici morfometrici calcolati sulla base delle misurazioni di cui alla Tabella 1

Rapporto curvorporeo (RCC)	AB/AC
Rapporto basorporeo (RBC)	AD/AC
Rapporto dorsorporeo (RDC)	BE/AC
Rapporto caudorporeo (RKC)	EF/AC
Rapporto ventrocorporeo (RVC)	GH/AC
Rapporto anorporeo (RAC)	HI/AC
Rapporto peduncolorporeo (RPC)	IJ/AC
Rapporto anterorporeo (RAC)	BK/AC
Rapporto posterorporeo (RPK)	EL/AC
Rapporto cefalorporeo (RKC)	AM/AC
Rapporto pettororporeo (RPK)	AN/AC
Rapporto interoculorporeo (RIOC)	OP/AC
Rapporto interlineorporeo anteriore (RILCA)	QR/AC
Rapporto interlineorporeo posteriore (RILCP)	ST/AC
Collocazione oculare (CO)	(UV/AC)/(WX/BK)
Rapporto anteroposteriore (RAP)	BK/EL
Rapporto intersegmentario 1 (RIS1)	AY/YZ
Rapporto intersegmentario 2 (RIS2)	AY/ZC
Rapporto intersegmentario 3 (RIS3)	YZ/ZC
Ripidità cefalica (RC)	$\alpha\beta/\delta\gamma$
Fattore di comparazione dimensionale (RCD)	(OP*QR*ST)/(AY*YZ*ZC)
Ripidità dorsale (RD)	$\alpha\beta/BK$
Ripidità corporea (RK)	EL/BK
Rapporto volumetrico craniorporeo (RVCC)	(RC*AM)/(RK*AC)

La centratura del pacchetto è stata effettuata in spirale con dati 100 Kv e 40 Ma. La ricostruzione è stata eseguita per osso e per disco.

Le orate venivano posizionate sul piano d'appoggio dello strumento in posizione latero-laterale. Si specifica che è stato effettuato il calcolo densitometrico delle vertebre in HU (unità di Hounsfield) prendendo come riferimenti specifici la densità della vescica natatoria (-982HU) e quella dei denti del pesce (> a 1000 HU).

Su tutti pesci è stato, inoltre, effettuato un esame anatomico-patologico nel corso del quale il pacchetto viscerale e le branchie venivano prelevati, fissati in formalina tamponata al 10%, inclusi in paraffina e le sezioni ottenute colorate con Ematossilina-Eosina (EE), e se necessario, con Blu di toluidina, Mc Manus (PAS), Grocott per i miceti, Gomori per fibre reticolari, Gram e Ziehl-Nielsen. Le colonne vertebrali sono state decalcificate in ac. nitrico al 3% prima di analogo processazione.

## RISULTATI

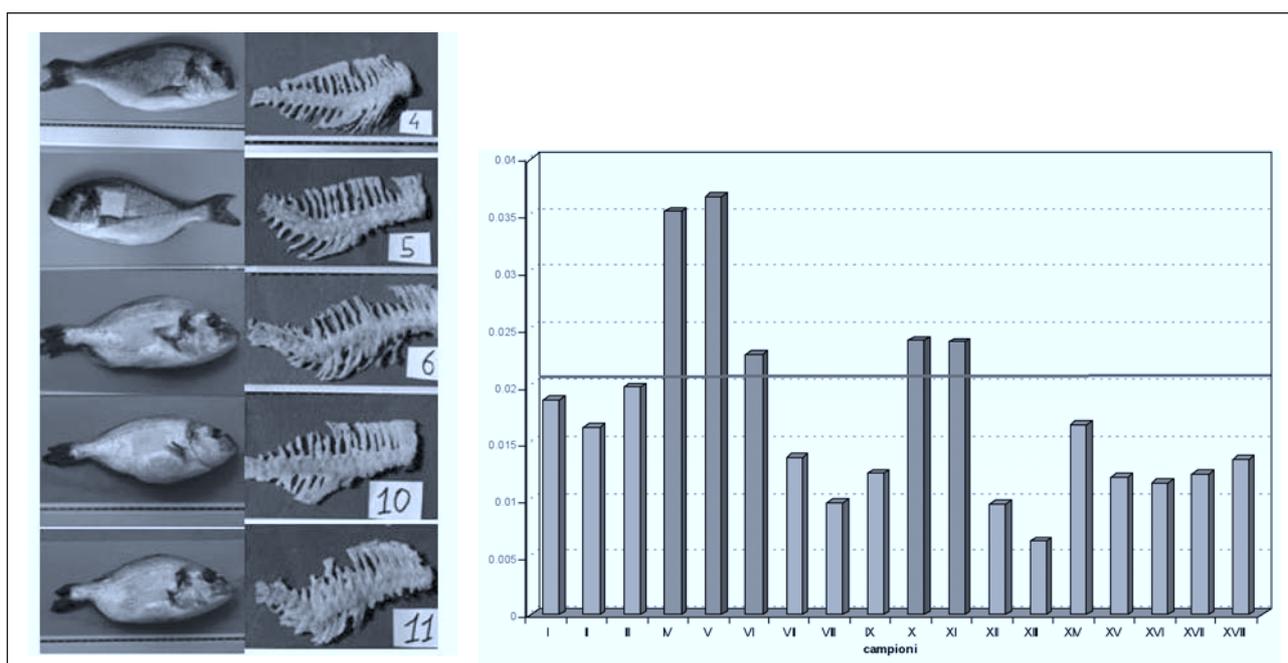
In merito alle valutazioni morfometriche si è appurato che diversi indicatori possono essere di un certo giovamento, ma quello sicuramente più affidabile per capacità discriminate tra gradi di deformità è il *Rapporto di Comparazione Dimensionale (RCD)* (grafico 1), che meglio esprime il livello di

modificazione dell'intero volume del pesce, in funzione della sovrapposizione di diverse anomalie (valori > 0.2).

Alla TAC, le varie ricostruzioni tomografiche in scansione assiale ma soprattutto in quella coronale che ha permesso una valutazione delle deformità mettendole a confronto con il tipo di deviazione, l'angolo della stessa e la densità ossea, hanno consentito di caratterizzare e misurare perfettamente il tipo e la gravità delle lesioni. Interessanti e meritevoli di approfondimenti con ulteriori metodologie sono poi le indicazioni densitometriche ancorché puramente indicative. Infatti, nei distretti in preda a deformità si osservava costantemente almeno un dimezzamento dei valori di densità in HU rispetto ai tratti normali.

L'esame anatomico-patologico degli organi delle 18 orate evidenziava in tre campioni un aumento di volume della milza, sede di numerose formazioni nodulari biancastre delle dimensioni di una capocchia di spillo; in uno, a carico del fegato, si osservava un nodulo delle dimensioni di 1x 0,5 x 0,5cm di colorito biancastro. Istologicamente si rilevavano in sei campioni numerosi granulomi micotici a carico della milza, del rene e del fegato. In tre soggetti, lesioni sovrapponibili si riscontravano a carico della vescica natatoria. Anche la grossa lesione epatica si rivelava essere un unico granuloma micotico. Detti granulomi risultavano Grocott positivi, Gram e Ziehl-Nielsen negativi e circondavano spore fungine di forma

Grafico 1: istogramma dei valori del "Rapporto di Comparazione dimensionale (RCD)" e rappresentazione dei campioni con RCD > 0.2



ovale o sferica delle dimensioni variabili da 20 a 200  $\mu$ m. Le spore evidenziavano una doppia parete PAS e Grocott positiva con componente esterna dai contorni irregolari. Il citoplasma delle spore era spesso vacuolizzato, debolmente basofilo, PAS-positivo, argirofilo e con numerosi nuclei di dimensioni variabili tra 1,6 e 3  $\mu$ m. Si poneva, dunque, diagnosi di ittiofonosi. Sempre microscopicamente, i distretti malformati della colonna vertebrale mostravano rarefazione del tessuto osseo denunciate da ampie vacuolizzazioni lacunari.

## CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI

Le valutazioni biometriche effettuate, suffragate da quelle tomografiche, dimostrano innanzitutto la potenziale utilità del marker biometrico “Rapporto di Comparazione Dimensionale” ai fini di una rapida e ripetibile individuazione e valutazione della gravità dei reperti. Rilevante, ci sembra ancora, l'ulteriore conferma di sofferenza scheletrica sovrapponibile a quella descritta nella spigola da Pellegrini et al. (1984) in assenza, però, di calcificazioni eterotopiche o emboli calcici a livello renale costituita essenzialmente da rarefazione ossea, peraltro già grossolanamente intuibile dai dati densitometrici offerti dalla TAC. Gli spunti d'ordine patogenetico del succitato Autore, riguardanti la potenziale responsabilità dello stress d'allevamento, potrebbero essere confermati anche per l'orata. L'eventualità della tecnopatia non ci pare in contrasto con l'ittiofonosi frequentemente accertata e già ricordata causa di alterazioni ossee; anch'essa, infatti, essendo malattia tipicamente cronica, innesca dunque, in quanto stressore, i meccanismi di ripristino dell'omeostasi. In conclusione, al di là degli accertamenti eziopatogenetici, riteniamo opportuno che le deformità ossee dei pesci d'allevamento, per quanto ricordato e accertato, siano monitorate dagli Operatori del Settore Alimentare della produzione primaria ai sensi del Regolamento CE 852/2004. La loro insorgenza, l'andamento, l'eventuale correzione spontanea in corso di accrescimento dovrebbero, dunque, essere utilmente riportate nel nuovo previsto registro in quanto patologie potenzialmente compromettenti la sicurezza dei prodotti oltre che certamente altri aspetti qualitativi.

## BIBLIOGRAFIA

- 1) Kincaid H.L. (1976) – Inbreeding in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). J. Fish Res. Board Can., 33, 2420-6.
- 2) Cahu C., Zambonino J.L., Takeuchi T. (2003) – Nutritional components affecting skeletal development in fish larvae. Aquaculture, 227, 245-258
- 3) Dennis Lemly A. (1997) – A teratogenic deformity index for evaluating impacts of selenium on fish population. Ecot. Environm. Safety, 37, 259-266.
- 4) Furuita H., Takeuchi T., Uematsu K. (1998) – Effects of eicosapentaenoic acids on growth, survival and brain development of larval Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). Aquaculture, 161, 269-279.
- 5) Phromkunthong W., Boonyaratpalin M., Storch V. (1997) – Different concentrations of ascorbyl-2-monophosphate-magnesium as dietary sources of vitamin C for seabass, *Lateolabrax japonicus*. Aquaculture, 151, 225-243.
- 6) Toften H., Jobling M. (1996) – Development of spinal deformities in Atlantic Salmon and Arctic charr fed diets supplemented with oxitetracycline. J. Fish Biol., 49, 668-677.
- 7) Sanchez-Bayo F., Goka K. (2005) – Unexpected effects of zinc pyrithione and imidacloprid on Japanese medaka fish (*Oryzias latipes*). Aquat. Toxicol., 74, 285-293.
- 8) Cunningham M.E., Markle D.F., Watral V. G., Kent M.L., Curtis L.R. (2005) – Patterns of fish deformities and their association with trematode cysts in the Willamette River, Oregon. Environm. Biol. Fishes, 73, 9-19
- 9) El-Matbouli A., Hoffmann R.W. (1992) - Effect Of Freezing, Aging And Passage Through The Alimentary Canal Of Predatory Animals On The Viability Of *Myxobolus cerebralis* Spores. J. Aquat Anim Health 3, 260-262.
- 10) Johnson D.W., Katavic I. (1984) – Mortality, growth and bladder stress syndrome of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae under varied environmental conditions. Aquaculture, 38, 67-78,
- 11) Pellegrini N., Taccini N., Macrì B., Ghelarducci L., Pambianco L.A., Panebianco A. Ercolini C. (1984) – Modificazioni della colonna vertebrale in *Dicentrarchus labrax*. Rilievi radiologici, anatomo-istopatologici e considerazioni patogenetiche. Annali Fac. Med. Vet. Messina, 37, 183-190.
- 12) Panebianco A., Minniti A. (1993). Alterazioni ossee in pesci del commercio: osservazioni d'ordine igienico-sanitario. Atti S.I.S.Vet., 47, 729-732.