



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

SCUOLA DI DOTTORATO IN

**RIPRODUZIONE, PRODUZIONE, BENESSERE ANIMALE E SICUREZZA DEGLI
ALIMENTI DI ORIGINE ANIMALE**

Direttore: Prof. Sergio Ledda

INDIRIZZO: Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale (XXVI CICLO)

Coordinatore: Prof. Enrico De Santis

**EPIDEMIOLOGIA, ASPETTI MORFOLOGICI E BIOMOLECOLARI DI
ANISAKIDI ED ETEROFIDI DI INTERESSE ZONOSICO IN SARDEGNA
(MEDITERRANEO OCCIDENTALE)**

Docente Guida

PROF. GIOVANNI GARIPPA

Correlatore

DOTT. PAOLO MERELLA

Direttore

PROF. SERGIO LEDDA

Tesi di dottorato della

DOTT.SSA MARIA CRISTINA PIRAS

ANNO ACCADEMICO 2012 – 2013



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

SCUOLA DI DOTTORATO IN

**RIPRODUZIONE, PRODUZIONE, BENESSERE ANIMALE E SICUREZZA DEGLI
ALIMENTI DI ORIGINE ANIMALE**

Direttore: Prof. Sergio Ledda

INDIRIZZO: Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale (XXVI CICLO)

Coordinatore: Prof. Enrico De Santis

EPIDEMIOLOGIA, ASPETTI MORFOLOGICI E BIOMOLECOLARI DI ANISAKIDI ED ETEROFIDI DI INTERESSE ZONOSICO IN SARDEGNA (MEDITERRANEO OCCIDENTALE)

Docente Guida

PROF. GIOVANNI GARIPPA

Correlatore

DOTT. PAOLO MERELLA

Direttore

PROF. SERGIO LEDDA

Tesi di dottorato della

DOTT.SSA MARIA CRISTINA PIRAS

ANNO ACCADEMICO 2012 - 2013

La presente tesi è stata prodotta nell'ambito della Scuola di Dottorato in Riproduzione, Produzione, Benessere Animale e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale dell'Università degli Studi di Sassari - XXVI ciclo, con il supporto di una borsa di studio finanziata con le risorse del P.O.R. SARDEGNA F.S.E. 2007-2013 - Obiettivo competitività regionale e occupazione, Asse IV Capitale umano, Linea di Attività I.3.1.

“La mente vive del cuore, come un altro parassita, se questo è robusto la mente è grassa. Ma se il cuore lesina l'ingegno deperisce.”

E. Dickinson

INDICE

ABSTRACT	V
RIASSUNTO	VI
1. INTRODUZIONE E SCOPO DELLA RICERCA	1
2. ANISAKIS SPP. (NEMATODA: ANISAKIDAE) IN SPECIE ITTICHE COMMERCIALI PESCATE NEL GOLFO DELL'ASINARA (SARDEGNA, MEDITERRANEO OCCIDENTALE)	5
Introduzione	6
Sistematica, biologia ed epidemiologia di <i>Anisakis</i> sp.	6
Anisakiasi	16
Anisakiasi in Italia	18
Materiali e metodi	21
Campionamento	21
Indagine parassitologica	22
Analisi molecolare	24
Analisi statistica	26
Risultati	28
Analisi molecolare	28
Analisi statistica	32
<i>Anisakis</i> nel muscolo	37
Discussione	40
3. CONTRACAECUM RUDOLPHII (NEMATODA: ANISAKIDAE) IN PHALACROCORAX CARBO SINENSIS (AVES: PHALACROCORACIDAE) DEGLI STAGNI DELL'ORISTANESE (SARDEGNA, MEDITERRANEO OCCIDENTALE)	46
Introduzione	47
Sistematica, biologia ed epidemiologia di <i>Contraecum</i> sp.	47
Anisakidosi	53
Cenni di sistematica e biologia del cormorano <i>Phalacrocorax carbo sinensis</i> (Blumenbach, 1798)	54
Materiali e metodi	56
Campionamento	56
Indagine parassitologica	58
Analisi molecolare	60
Analisi statistica	61
Risultati	63
Descrizione morfologica dei parassiti	63
Analisi molecolare	68
Analisi statistica	71
Discussione	73

4. ASCOCOTYLE SP. ED HETEROPHYES SPP. (TREMATODA: HETEROPHYIDAE) NEI MUGGINI (OSTEICHTHYES: MUGILIDAE) DEGLI STAGNI DELL'ORISTANESE (SARDEGNA, MEDITERRANEO OCCIDENTALE)	77
Introduzione	78
Sistematica, biologia ed epidemiologia della famiglia Heterophyidae.	78
Eterofidosi	90
Materiali e metodi	93
Campionamento	93
Indagine parassitologica	100
Infestazione sperimentale	104
Analisi molecolare	105
Analisi statistica	107
Risultati.....	108
Descrizione dei gruppi morfologici di metacercarie.....	109
Parassiti adulti	118
Analisi molecolare	126
Analisi statistica	129
Discussione.....	134
5. ANALISI CRITICA DELLA NORMATIVA RELATIVA AL CONTROLLO DELLE ZONOSI PARASSITARIE DI ORIGINE ITTICA	142
CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE	156
BIBLIOGRAFIA.....	161
RINGRAZIAMENTI	176

ABSTRACT

Anisakidae and Heterophyidae include fish-borne zoonotic parasites transmitted to man by the ingestion of larval stages in fish. This study is a contribution to the molecular identification and epidemiology of these parasites from Sardinia (Mediterranean Sea).

In commercial fish from the Gulf of Asinara, 1.286 larvae of *Anisakis* sp. were found in 218 out of the 777 fish examined. Most of larvae (99%) were of the Type I, and a small part Type II. The molecular data confirmed previous studies: all Type I larvae were identified as *A. pegreffii* and all Type II as *A. physeteris*. The high infection levels confirm the diffusion of this parasite in the Mediterranean Sea.

All cormorants from the Oristano lagoons were infected by *Contracaecum rudolphii*. After molecular analysis all larvae and most of adults were identified as *C. rudolphii* A, and a small part of adults as *C. rudolphii* B, confirming that the first predominantly infects cormorants from coastal lagoons, and the second from freshwater.

In mugilids from the Mistras Lagoon, 86% of hosts were infected by heterophyid metacercariae in the muscle. After morphological analysis four morphological groups were detected. The molecular analysis of metacercariae and adults (obtained by experimental infection) confirmed the morphological classification. The results confirmed the presence of *Heterophyes* sp. and *Ascocotyle (Phagicola)* sp. in mugilids from the Mistras Lagoon, and provided for the first time their molecular description.

RIASSUNTO

Le famiglie Anisakidae ed Heterophyidae comprendono parassiti zoonosici che possono infestare l'uomo in seguito al consumo di pesce crudo o poco cotto. La presente indagine è un contributo all'identificazione molecolare ed all'epidemiologia di questi parassiti in pesci della Sardegna (Mar Mediterraneo occidentale).

Relativamente alla presenza di larve di *Anisakis* sp. in specie ittiche commerciali del Golfo dell'Asinara, in 218 dei 777 ospiti esaminati sono state repertate 1.286 larve. Il 99% sono state identificate morfologicamente come di Tipo I, e l'1% di Tipo II. L'analisi molecolare ha confermato gli studi precedenti: tutte le larve di Tipo I sono state identificate come *A. pegreffii*, e quelle di Tipo II come *A. physeteris*. Gli elevati livelli d'infestazione riscontrati confermano la diffusione di questo parassita nel Mar Mediterraneo.

Riguardo la presenza di *Contracaecum rudolphii* nei cormorani delle lagune dell'oristanese, la prevalenza è risultata del 100%. L'analisi molecolare ha permesso di identificare tutte le larve e la maggior parte degli adulti come *C. rudolphii* A, e una piccola parte di adulti come *C. rudolphii* B. Viene pertanto confermato che la prima è la principale specie presente in ambienti marini o salmastri, mentre il ciclo della seconda si svolge prevalentemente in ambienti dulciacquicoli.

L'indagine sugli eterofidi nei muggini pescati nello Stagno di Mistras, ha rivelato che l'86 % degli ospiti presentava metacercarie nel muscolo, che in base agli esami morfologici sono stati raggruppate in quattro gruppi. L'analisi molecolare delle metacercarie e degli adulti (repertati in seguito ad infestazione sperimentale) hanno confermato la classificazione su base morfologica. I risultati confermano la presenza di *Heterophyes* sp. e *Ascocotyle (Phagicola)* sp. nei muggini dello Stagno di Mistras, e forniscono per la prima volta una caratterizzazione molecolare di questi parassiti.

CAPITOLO 1

INTRODUZIONE E SCOPO DELLA RICERCA

Gli alimenti possono trasmettere all'uomo numerosi patogeni di natura batterica, virale o parassitaria causando varie patologie che sono tutt'ora un rilevante problema di sanità pubblica. Le zoonosi di origine alimentare rappresentano una seria minaccia per la salute pubblica in tutto il mondo, e nella sola Unione Europea sono riportati ogni anno più di 320.000 casi di patologie di origine alimentare, dato che si ritiene peraltro sottostimato (EFSA, 2013).

La sicurezza alimentare, da sempre uno dei capisaldi della sanità pubblica, sta acquisendo sempre maggiore importanza e interesse, ciò in virtù dei continui cambiamenti nei sistemi di approvvigionamento degli alimenti (filieri alimentari più lunghe rispetto al passato), dell'aumento della popolazione sensibile a rischi derivanti dal consumo di alimenti (aumento dei soggetti in condizioni critiche o di immunodepressione), della modifica dei comportamenti sociali (ricorso alla ristorazione collettiva, acquisizione di nuove abitudini alimentari) (Croci et al., 2001; Salmaso et al., 2001).

Per tali motivi, negli ultimi decenni le patologie trasmesse con gli alimenti hanno ricevuto una attenzione particolare. Si tratta di patologie che nei paesi maggiormente sviluppati possono essere considerate emergenti o ri-emergenti, che si manifestano in maniera inaspettata e imprevedibile, e la cui presenza è spesso conseguenza di cambiamenti nelle abitudini sociali e alimentari. Alcune di queste patologie vengono considerate emergenti in quanto diventano più comuni, o vengono diagnosticate più frequentemente, anche grazie all'avvento di nuove metodiche diagnostiche (Dorny et al., 2009).

Inoltre, le patologie trasmesse con gli alimenti sono un importante problema anche per il notevole impatto economico, sia in termini di morbilità e costi per la sanità pubblica, che per la loro influenza sulle produzioni (Marcus et al., 2012). In particolare quelle di natura parassitaria si caratterizzano per il difficile controllo a causa della complessità del ciclo biologico degli agenti eziologici e delle articolate vie di trasmissione (Thompson, 2000).

L'interesse nei confronti delle zoonosi parassitarie di origine ittica ha avuto un notevole aumento nei paesi occidentali, in particolare in quelli dell'Unione

Europea, che nei regolamenti contenuti nel Pacchetto Igiene ha anche normato questo aspetto (Reg. 853-854/2004, Reg. 2074/2005).

In passato il rischio per l'uomo di infestazioni da parassiti ittici era considerato limitato a specifiche regioni geografiche. Sebbene in alcune aree, in particolare nei paesi in via di sviluppo, la loro prevalenza sia fortemente diminuita a seguito di fattori quali lo sviluppo socio-economico, l'urbanizzazione, l'applicazione di procedure di ispezione degli alimenti, le campagne di educazione sanitaria (Fried et al., 2004), si assiste oggi ad una espansione dei limiti geografici di alcune patologie, ad un aumento delle popolazioni a rischio, e talvolta a fenomeni di recrudescenza o di emergenza. Le cause di tali fenomeni vanno ricercate sostanzialmente nella crescita degli scambi internazionali, nello sviluppo del sistema dei trasporti, negli scambi demografici, e nei conseguenti cambiamenti degli stili di vita e delle abitudini alimentari (Chai et al., 2005; Dorny et al., 2009; Broglia et al., 2011).

Gli organismi acquatici rivestono un ruolo importante nel ciclo biologico di parassiti a ciclo indiretto, che allo stadio larvale o adulto sono in grado di determinare patologia nell'uomo. Questo può quindi comportarsi sia da ospite definitivo che accidentale (Fioravanti e Restani, 2003). In relazione alla prima eventualità vanno citate numerose malattie parassitarie, fra cui alcune causate da cestodi (difillobotriosi), altre da trematodi (eterofidosi, opistorchiasi, clonorchiasi, paragonimiasi) e da nematodi (dioctofimosi e capillariosi), tutte sostenute da elminti che raggiungono lo stadio adulto nell'uomo. Per quanto riguarda la seconda possibilità vanno ricordate anisakidosi, gnatostomiasi e clinostomosi, malattie parassitarie i cui agenti eziologici possono causare accidentalmente patologia nell'uomo, avendo altri vertebrati come ospiti definitivi.

Negli ultimi decenni sono stati condotti numerosi studi sull'anisakiasi ittica ed umana, con la descrizione di numerosi casi nell'uomo e studi epidemiologici e molecolari sulle larve di nematodi del genere *Anisakis* (Chai et al., 2005; Mattiucci e Nascetti, 2006; D'amelio et al., 2013) anche in virtù della

distribuzione globale di questo parassita e del gran numero di ospiti paratenici che contribuiscono alla sua diffusione. La presente tesi vuole essere un contributo alle conoscenze relative a questo nematode, ed inoltre approfondire anche quelle su altri due agenti di zoonosi di origine ittica: i nematodi anisakidi *Contraecum rudolphii*, ed i trematodi eterofidi *Ascocotyle* sp. ed *Heterophyes* spp.

Il lavoro è articolato in tre sezioni:

- aggiornare le conoscenze sulla presenza, distribuzione e sistematica molecolare dei nematodi del genere *Anisakis* in diverse specie ittiche di interesse commerciale del Golfo dell'Asinara (Sardegna settentrionale).
- approfondire le conoscenze sui nematodi del genere *Contraecum* nei cormorani degli stagni dell'oristanese (Sardegna occidentale).
- studiare presenza, diffusione e livelli di infestazione dei trematodi eterofidi dei generi *Ascocotyle* ed *Heterophyes* nei muggini degli stagni della Sardegna.

CAPITOLO 2

***ANISAKIS* SPP. (NEMATODA: ANISAKIDAE) IN SPECIE ITTICHE COMMERCIALI PESCATE NEL GOLFO DELL'ASINARA (SARDEGNA, MEDITERRANEO OCCIDENTALE)**

INTRODUZIONE

Sistematica, biologia ed epidemiologia di *Anisakis* sp.

Classificazione

L'esatta identificazione delle differenti specie di *Anisakis* rappresenta un requisito fondamentale, non solo per la sistematica parassitologica, ma anche per lo studio dell'ecologia e dell'epidemiologia del parassita e dei suoi ospiti, e per la diagnosi della parassitosi nell'uomo (anisakiasi).

La superfamiglia Ascaridoidea (Ordine Ascaridida) comprende nematodi di medie e grandi dimensioni, caratterizzati dalla presenza di tre labbra spesso separate da interlabia. I parassiti adulti normalmente si localizzano a livello gastrico o intestinale dell'ospite definitivo, e si alimentano del cibo ingerito e di muco e fluidi.

La superfamiglia si divide in cinque famiglie, di cui la principale è quella Anisakidae, che comprende parassiti di mammiferi marini, uccelli ittiofagi, rettili e pesci. Essa è suddivisa in tre sottofamiglie: Goeziinae, Anisakinae e Raphidascaridinae. Agli Anisakinae appartengono, tra gli altri, i generi *Anisakis*, *Peudoterranova*, *Contracecum* e *Phocascaris*, dei quali i primi tre rivestono importanza sanitaria in quanto agenti di zoonosi (Anderson, 2000).

I nematodi del genere *Anisakis* sono caratterizzati dal notevole sviluppo del ventricolo ghiandolare e dall'assenza di appendici esofagee ed intestinali, ed in base a tali caratteristiche è possibile distinguerli dagli altri generi (Figura 2.1).

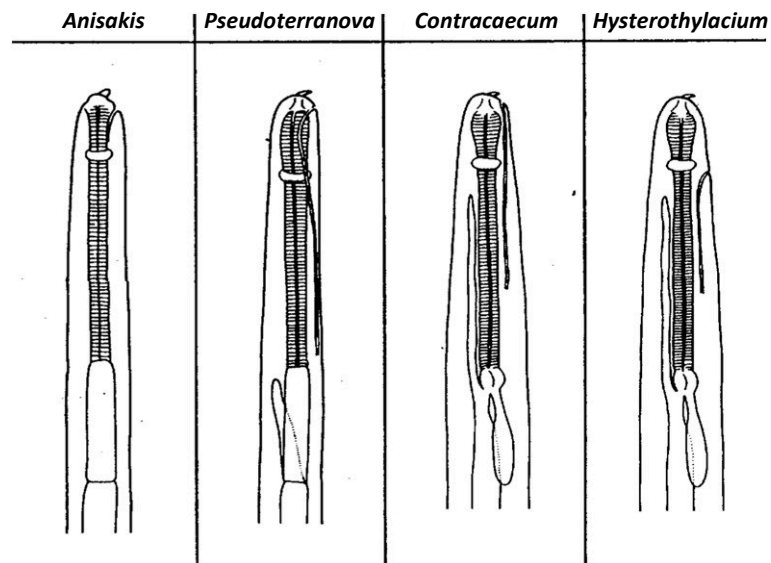


Figura 2.1. Caratteristiche morfologiche del tratto anteriore dei principali generi della famiglia Anisakidae.

Gli adulti di *Anisakis* sp. (Figura 2.2) sono color crema, i maschi misurano circa 6 cm, e sono più corti delle femmine, che possono arrivare sino a 20 cm di lunghezza. L'apertura orale è delimitata da tre labbra, i cui margini presentano una fila di piccoli denti. Nel maschio l'estremità caudale è priva di ali cuticolari e presenta papille pre-e post-anali. Gli spicoli sono sottili e lunghi più di 1,5 mm.



Figura 2.2. Adulti di *Anisakis* sp.

Le larve di terzo stadio (L₃) di *Anisakis* sp. hanno una lunghezza di 1,2-5 cm (Figura 2.3). La cuticola è striata trasversalmente, il poro escretore è situato ventralmente in prossimità dell'estremità cefalica, munita di labbra incospicue e un dente larvale. L'esofago presenta una lunga porzione muscolare e il ventricolo è ben sviluppato. Sono assenti cieco intestinale ed appendice esofagea, e non sono presenti gonadi ed organi genitali.

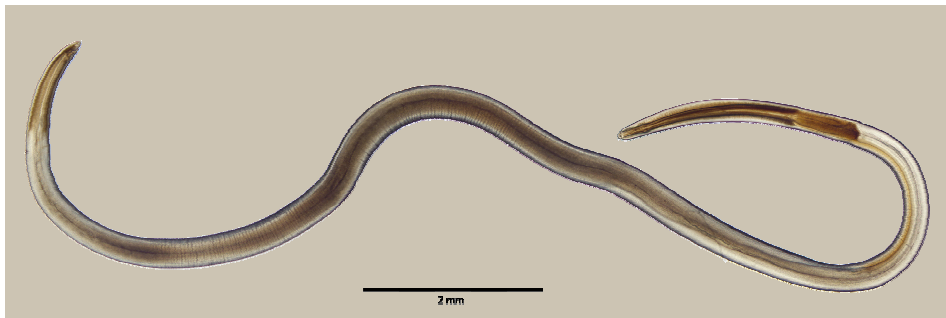


Figura 2.3. Larva di terzo stadio di *Anisakis* sp.

Nel 1961 Berland identificò due differenti morfotipi di L₃ di *Anisakis*, denominati Tipo I e II; che vengono discriminate in base alle seguenti caratteristiche morfologiche (Figura 2.4):

- ✓ Tipo I, ventricolo allungato, giunzione ventricolo-intestino obliqua, estremità caudale arrotondata e provvista di mucrone;
- ✓ Tipo II, ventricolo corto, giunzione ventricolo-intestino retta, estremità caudale conica e priva di mucrone.

Studi recenti hanno dimostrato che l'esatta identificazione di specie delle larve di terzo stadio appartenenti a questo genere può essere effettuata solo su basi molecolari; infatti le L₃ di *Anisakis* sono un complesso di sibling species, o specie gemelle, morfologicamente identiche, ma con diversa struttura genetica, distribuzione geografica ed ospiti preferenziali (Mattiucci et al., 2002a, 2005; Mattiucci e Nascetti, 2008).

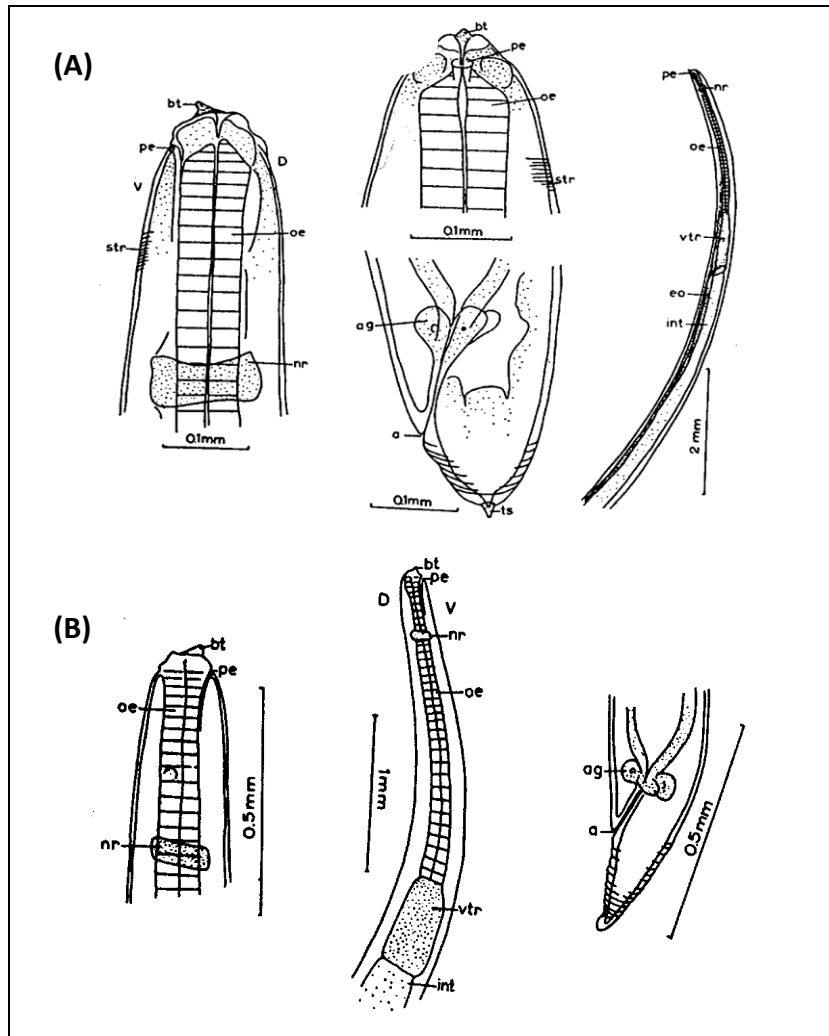


Figura 2.4. Caratteristiche morfologiche delle larve di terzo stadio di *Anisakis* Tipo I (A) e Tipo II (B) (da Berland, 1961).

L'utilizzo di marcatori genetici, l'applicazione della PCR-RFLP della porzione di DNA ribosomiale del gene ITS (Internal Transcribed Spacer), e il sequenziamento della subunità ribosomiale LSUrDNA (D'Amelio et al., 2000; Nadler et al., 2000, 2005; Zhu et al., 2001, 2002; Hu et al., 2001; Li et al., 2005) e del gene mitocondriale *cox-2* (Valentini et al., 2006; Mattiucci et al., 2007a) hanno dimostrato che il genere *Anisakis* comprende attualmente nove specie, e hanno permesso la definizione di due cladi ben definiti all'interno del genere *Anisakis* (Paggi et al., 1998; Mattiucci et al., 2001; 2002a; 2005; Pontes et al., 2005; Mattiucci e Nascetti, 2006). Nel clade 1 risultano incluse sei specie:

Anisakis simplex sensu stricto Nascetti et al., 1986, *Anisakis pegreffii* Campana-Rouget e Biocca, 1955, *Anisakis simplex* C (Mattiucci et al., 1997), *Anisakis typica* (Diesing, 1860), *Anisakis ziphidarum* Paggi et al., 1998 e *Anisakis nascettii* Mattiucci, Paoletti e Webb, 2009. Al clade 2 appartengono le tre specie rimanenti: *Anisakis physeteris* Baylis, 1923, *Anisakis brevispiculata* Dollfus, 1968 e *Anisakis paggiae* Mattiucci et al., 2005. La forma larvale (L₃) di tutte le specie comprese nel clade 1 è ricondotta al Tipo I, mentre quelle comprese nel clade 2 sono riconducibili al Tipo II (*sensu* Berland, 1961).

Ciclo biologico (Figura 2.5)

Gli adulti del genere *Anisakis* sono parassiti di cetacei odontoceti e mysticeti, si localizzano a livello dello stomaco, dove si nutrono di muco, fluidi e residui di cibo. Come tutti i nematodi sono a sessi separati, le femmine liberano le uova nello stomaco dell'ospite, che le elimina nell'ambiente acquatico con le feci (Figura 2.5 A). Le uova misurano 40 X 50 µm, hanno una parete sottile, embrionano nell'ambiente e schiudono dopo 1-4 settimane (Van Banning et al., 1971). Le uova liberano larve del secondo stadio (L₂) guainate (Figura 2.5 B) che possono sopravvivere per 3-4 settimane nella colonna d'acqua, dove vengono ingerite dagli ospiti intermedi, rappresentati da piccoli crostacei eufasidi o copepodi (Figura 2.5 C), di cui invadono l'emocele, e sviluppano a larve di terzo stadio (L₃) (Smith et al., 1971, 1983a; Klimpel et al., 2004). Secondo alcuni autori le prime due mute avverrebbero nell'uovo, con conseguente liberazione delle larve L₃ (D'Amelio et al., 2010, 2013).

Se gli ospiti intermedi vengono predati da organismi diversi dagli ospiti definitivi (pesci, cefalopodi, crostacei, etc.) le larve permangono al terzo stadio (ospiti paratenici) (Figura 2.5 D). Nei pesci le L₃ attraversano la parete intestinale, guadagnano la cavità celomatica e si incapsulano in vari tessuti (mesentere, fegato, gonadi, etc.). Una parte delle larve può migrare nella muscolatura, in particolare in quella ipoassiale, e questo può avvenire sia quando l'ospite è vivo (migrazione *intravitam*), che dopo la sua morte (migrazione *postmortem*).

Mediante la rete trofica i vari ospiti paratenici possono trasmettere le L₃ a predatori, determinando il passaggio in un nuovo ospite paratenico, e contribuendo così alla diffusione spazio-temporale del parassita (Figura 2.5 E). I cetacei si infestano ingerendo gli ospiti intermedi o gli ospiti paratenici, a seconda delle abitudini alimentari. Nell'ospite definitivo le larve di terzo stadio mutano al quarto, differenziandosi in maschi e femmine, e quindi divengono adulti (Figura 2.5 F). Raggiunta la maturità sessuale gli adulti si accoppiano, depongono le uova e il ciclo riprende.

L'uomo rientra nel ciclo di questi parassiti come ospite accidentale, in seguito all'assunzione di ospiti intermedi o paratenici parassitati. Nell'uomo le larve non raggiungono la maturità, anche se secondo alcuni autori possono mutare dal terzo al quarto stadio (Ishii et al., 1989).

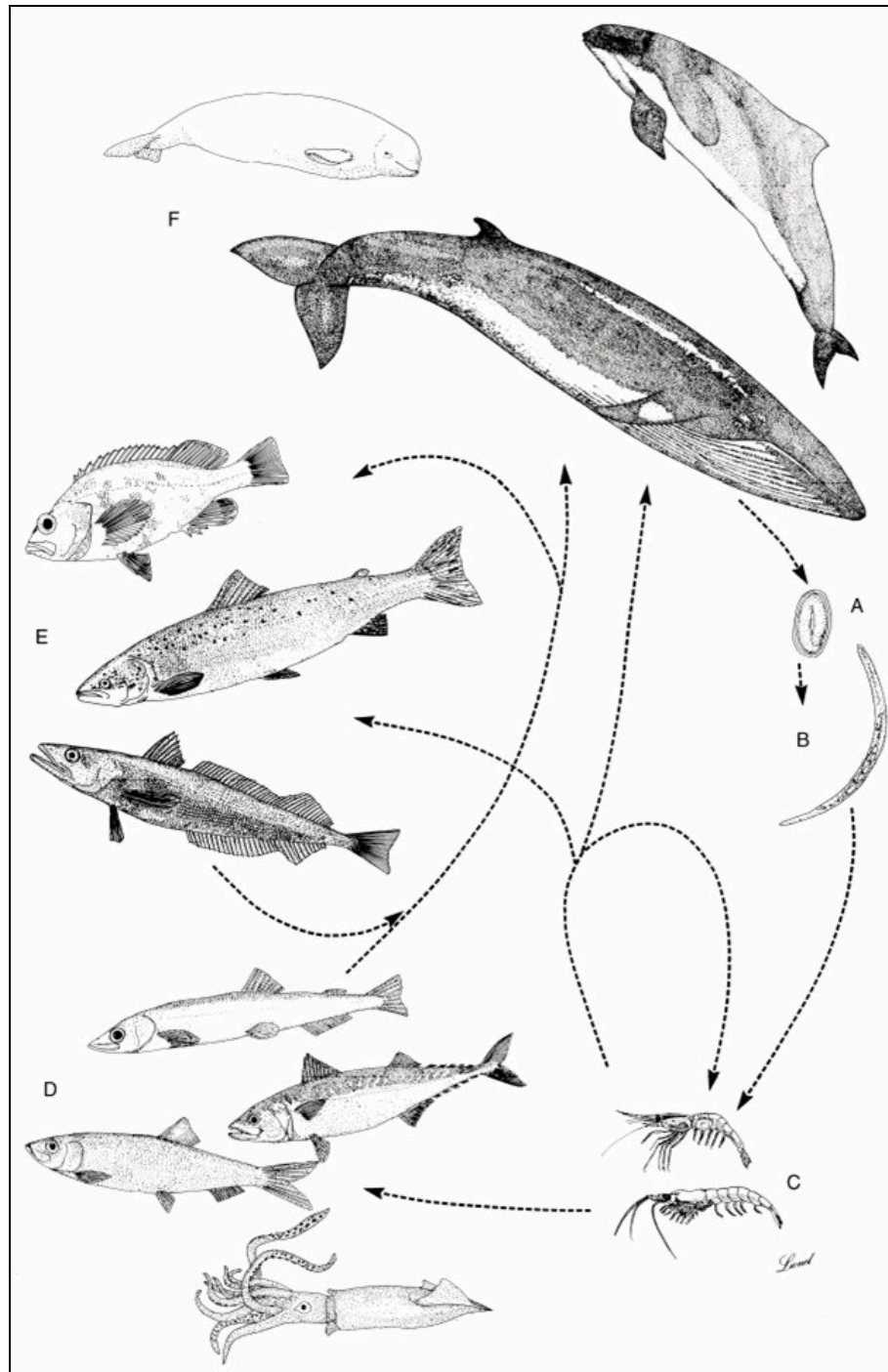


Figura 2.5. Ciclo di *Anisakis* spp., da Anderson (2000). Per l'interpretazione delle sigle A-F vedere il testo.

Distribuzione geografica

Le diverse specie di *Anisakis* sono caratterizzate ciascuna da una precisa distribuzione geografica (Mattiucci e Nascetti, 2006, 2008).

Anisakis simplex sensu stricto (s.s.) è stata repertata principalmente nell'Oceano Atlantico e nell'Oceano Pacifico tra il 35° parallelo Nord e il Circolo Polare Artico. Il limite meridionale della sua distribuzione sembra essere nell'Oceano Atlantico centro orientale, nell'area di Gibilterra. Questa specie è stata raramente trovata nel Mar Mediterraneo, probabilmente come risultato della migrazione di specie pelagiche attraverso lo stretto di Gibilterra verso il Mar di Alboran (Mattiucci et al., 2004, 2007).

Anisakis pegreffii è distribuita fundamentalmente nel Mar Mediterraneo e nell'Oceano Atlantico meridionale. È la principale specie del Mar Mediterraneo, ed è stata repertata in pesci pelagici e demersali. Aree di simpatria tra *A. simplex* s.s. e *A. pegreffii* sono state identificate lungo le coste atlantiche spagnole e portoghesi (Abollo et al., 2001; Mattiucci et al., 2004, 2007a) e nel Mar di Alboran (Mattiucci et al., 2004, 2007a). La presenza di questa specie è stata documentata anche in acque giapponesi (Umehara et al., 2006) e in Nuova Zelanda (Mattiucci e Nascetti, 2006).

Anisakis simplex C ha una distribuzione a “macchia di leopardo” (D'Amelio et al., 2013), è stata repertata nelle acque dell'Oceano Pacifico in Canada, Cile e Nuova Zelanda, e nel sud est Atlantico (Mattiucci et al., 2007a).

Anisakis typica è stata generalmente riscontrata in acque temperate e tropicali comprese tra il 30° parallelo Sud e il 35° Nord, nel Mediterraneo orientale, nelle acque della Somalia e nell'Oceano Indiano (Mattiucci et al., 2002, 2007a). Adulti e larve di queste specie sono state evidenziate in diverse specie di mammiferi marini e pesci nel Golfo del Messico, nelle coste del Brasile, in Somalia, Mauritania, e Marocco. Il riscontro di questa specie nelle acque del Mar Mediterraneo orientale è da imputarsi alla migrazione di ospiti intermedi o paratenici provenienti dal Mar Rosso attraverso il Canale di Suez (Mattiucci e Nascetti, 2006).

Anisakis ziphidarum è stata repertata nelle coste del Sud Africa, nel Mar Mediterraneo e nelle acque dell'Oceano Atlantico Centrale.

Anisakis nascettii è stata descritta nelle coste di Madeira, e nel nord est della Spagna, oltre che in Sud Africa e in Nuova Zelanda (Mattiucci et al., 1998; Iglesias et al., 2008).

Anisakis physeteris è presente nel Mar Mediterraneo, comprese le coste del Nord Africa (Farjallah et al., 2008^{a,b}), lungo le coste atlantiche della Spagna, nell'Oceano Atlantico centrale e nel Golfo del Messico (Mattiucci et al., 2007a).

Anisakis brevispiculata e *Anisakis paggiae* sono state riscontrate nelle zone temperate dell'Oceano Atlantico, dal Golfo del Messico sino alle coste della Penisola Iberica (Mattiucci et al., 2005, 2007a, 2009).

Specie-specificità dell'ospite

Ciascuna delle specie appartenenti al genere *Anisakis* è associata a specifici ospiti definitivi (Figura 2.6).

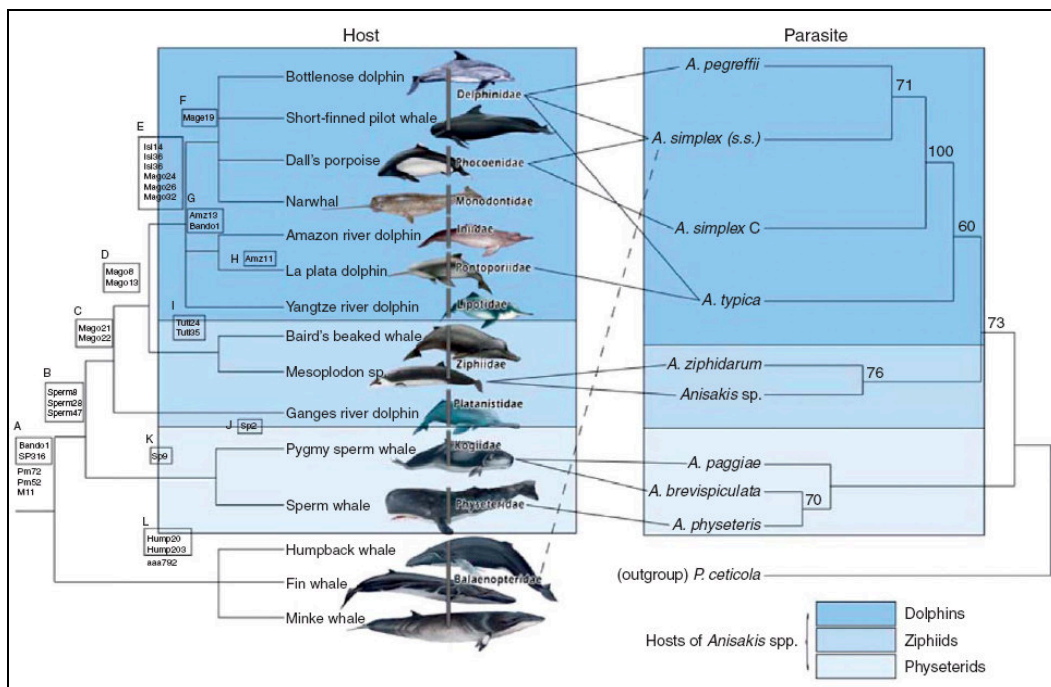


Figura 2.6. Specie specificità di *Anisakis* spp. per l'ospite definitivo (da Mattiucci e Nascetti, 2008).

Ospiti definitivi di *A. simplex* s.s. sono cetacei appartenenti alle famiglie *Delphinidae*, *Monodontidae* e *Phocoenidae*. Questa specie è stata frequentemente repertata in: *Balaenoptera acutorostrata*, *Delphinapterus leucas*, *Delphinus delphis*, *Globicephala melaena*, *Lagenorhynchus albirostris*, *Orcinus orca*, *Pseudorca crassides*, *Phocoena phocoena* e più raramente in *Stenella coeruleoalba* (Mattiucci e Nascetti, 2006).

Gli adulti di *A. pegreffii* sono parassiti di *D. delphis*, *Ziphius cavirostris* e *Tursiops truncatus*. Questa specie è stata repertata anche in Sud Africa in *Caperea marginata* (Mattiucci e Nascetti, 2006).

Anisakis simplex C è stata repertata nello stomaco di *L. albirostris*, *Lissodelphis borealis* e *P. crassidens* (Mattiucci e Nascetti, 2006).

Le due specie *A. ziphidarum* e *A. nascettii* infestano soprattutto cetacei appartenenti alla famiglia Ziphiidae. La prima è stata riscontrata in *Z. cavirostris*, *Mesoplodon layardii*, *M. europaeus* e *M. densirostris*. *Anisakis nascettii* è stata repertata nello stomaco di *M. layardii*, *M. densirostris*, *M. mirus* e *M. grayi* (Mattiucci e Nascetti, 2006).

La presenza di adulti appartenenti alla specie *A. typica* è stata documentata da Mattiucci e Nascetti (2006) e D'Amelio et al. (2005) in *Globicephala macrorhynchus*, *Sotalia fluviatilis*, *Steno bredanensis*, *Stenella attenuata*, *S. longirostris*, *S. coeruleoalba*, *T. truncatus*, *Lagenodelphis hosei* e *M. bidens*.

Le specie di *Anisakis* appartenenti al clade 2 sono associate prevalentemente ad ospiti definitivi con predilezione alimentare verso i cefalopodi (D'Amelio et al., 2013), considerati ospiti paratenici preferenziali per le larve di terzo stadio del Tipo II (Mattiucci e Nascetti, 2008). Il principale ospite definitivo di *A. physeteris* è il capodoglio, *Physeter macrocephalus* anche se questa specie è stata repertata nel capodoglio pigmeo *Kogia breviceps*. *Anisakis brevispiculata* e *A. paggiae* sono state evidenziate in *K. breviceps*, e nel capodoglio nano *K. sima* (D'Amelio et al., 2013).

Anisakiasi

Con il termine anisakiasi viene indicata la zoonosi parassitaria causata dall'ingestione accidentale di larve L₃ vive appartenenti al genere *Anisakis* in seguito al consumo di preparazioni alimentari a base di pesce o cefalopodi crudi, poco cotti, o sottoposti a trattamenti non in grado di devitalizzarle.

L'anisakiasi si manifesta nell'uomo in due diverse forme, invasiva e non invasiva, identificate sulla base delle caratteristiche anatomo-patologiche delle lesioni, a loro volta distinte a seconda della localizzazione delle larve. La localizzazione principale è quella gastro-enterica, meno frequenti sono quella esofagea e quella extragastrointestinale (splenica, mesenterica, omentale).

La forma non invasiva, o luminale, è spesso asintomatica. Le larve non penetrano la mucosa, e la diagnosi viene effettuata a seguito del riscontro delle larve espulse con tosse, vomito o feci. In questo caso le infestazioni sono localizzate principalmente nello stomaco, e meno frequentemente (30%) nell'intestino. I pazienti possono manifestare dolori epigastrici, nausea, vomito, diarrea e occasionalmente orticaria, da 1 a 15 ore dopo l'ingestione delle larve.

Nella forma invasiva le larve penetrano nella parete del tubo gastro-enterico. Si riscontrano due sindromi in funzione della localizzazione delle larve: anisakiasi gastrica e anisakiasi intestinale. La prima è caratterizzata da una sintomatologia dolorosa improvvisa che compare da 1 a 7 ore dall'ingestione dei pesci infestati con passaggio alla cronicità in caso di mancata diagnosi. L'anisakiasi intestinale è caratterizzata da insorgenza più tardiva, con dolori intestinali acuti che si manifestano da 1 a 5 giorni dopo l'ingestione dei pesci infestati. Le lesioni sono caratterizzate dalla formazione di un granuloma eosinofilo con al centro il parassita (Boireau et al., 2002).

Nella forma extragastrointestinale o ectopica la larva ingerita con l'alimento riesce a penetrare attraverso la mucosa gastrointestinale come accade nella forma invasiva, ma in questa particolare e rara manifestazione dell'anisakiasi il parassita riesce, attraversando diversi organi e tessuti, a migrare anche in sedi lontane da quella dell'iniziale perforazione gastrointestinale.

Queste larve determinano nell'uomo la cosiddetta sindrome da "larva migrante" (*larva migrans visceralis*) e si possono localizzare a livello di cavità addominale, mesentere, parete addominale, grande omento, pancreas, fegato, lingua, polmone, gangli linfatici, tessuti peritesticolari. Una volta raggiunta una di queste sedi possono determinare una reazione da corpo estraneo, che può evolvere come flemmone, ascesso-granuloma o più frequentemente come granuloma (Griglio et al., 2012).

La diagnosi definitiva di anisakiasi avviene attraverso l'esame istopatologico della lesione, o attraverso l'esame radiologico. Più spesso la diagnosi coincide con la terapia e quindi con l'asportazione della larva durante l'esame gastroscopio. Test cutanei (skin prick test) e sierologici (ELISA, immunoblot) non risultano ancora pienamente attendibili (D'amelio et al., 2013).

L'anisakiasi gastrica è spesso erroneamente diagnosticata come ulcera gastrica, neoplasia o polipo, mentre quella intestinale può essere confusa con appendicite acuta, peritonite o morbo di Crohn (Chai et al., 2005; Montalto et al., 2005).

Anche in seguito a devitalizzazione delle larve attraverso la cottura o il congelamento queste possono rappresentare un pericolo per la salute dell'uomo. Infatti gli antigeni di questo parassita sembrano essere straordinariamente resistenti sia alle basse che alle alte temperature, e l'esposizione ad essi può essere causa di Sindrome Orticaria Angioedema, con formazione di ponfi transitori e pruriginosi, ed aree edematose che interessano il derma e il tessuto sottocutaneo; forme più gravi sono caratterizzate da insorgenza di shock anafilattico (AAITO-IFIACI, 2011). Deve essere però evidenziato che alcuni autori mettono in dubbio che larve non vitali di *Anisakis* siano in grado di causare fenomeni allergici (Daschner, 2011). Fenomeni di orticaria e sindrome anafilattica associati ad infestazioni gastro-intestinali di *Anisakis* furono descritti per la prima volta in Giappone (Kasuya et al., 1990), e successivamente il parassita fu identificato come agente eziologico di altre reazioni allergiche mediate da IgE (Audicana et al., 1997). È stato suggerito che

molte allergie verso i prodotti della pesca siano in realtà reazioni nei confronti di *Anisakis* (Audicana et al., 1997, 2002).

La prima segnalazione di infestazione umana da *Anisakis simplex* (*sensu lato*) avvenne in Groelandia e risale al 1876 ad opera dello zoologo tedesco Rudolf Leuckart (Anon, 1998).

Nel 1958 Ishikura e Asanuma (vedi Ishikura et al., 1993) descrissero il primo caso di localizzazione intestinale in un pescatore giapponese. Il primo caso dovuto al consumo di aringhe affumicate a freddo in Europa fu segnalato nel 1960 da Van Thiel, che descrisse il parassita nell'intestino di un paziente suo connazionale operato per addome acuto. Per questo motivo il parassita venne considerato e denominato "il verme delle aringhe" (herringworm). Da allora questa patologia è stata descritta in migliaia di pazienti, e l'anisakiasi è stata correlata al consumo del pesce crudo in generale, e non solo a quello delle aringhe affumicate. Degli oltre 20.000 casi segnalati in tutto il mondo, il 90% sono descritti in Giappone, il restante 10% in Europa, Stati Uniti, Canada, Nuova Zelanda, Cile ed Egitto (Chai et al., 2005; Umehara et al., 2007).

Anisakiasi in Italia

Il primo caso accertato in Italia è stato descritto nel 1996 a Bari in una donna quarantenne (Stallone et al., 1996). Nel nostro Paese, dal 1996 ad oggi, sono descritte alcune decine di casi. Le segnalazioni documentate in letteratura di anisakiasi umana in Italia sono riassunte in Tabella 2.I; a queste vanno aggiunti i numerosi casi osservati presso le strutture ospedaliere e spesso non riportati in letteratura. Dall'analisi dei dati si evince che l'anisakiasi è particolarmente frequente nelle regioni centro meridionali (Puglia, Abruzzo, Molise e Sicilia), mentre casi sporadici sono descritti in altre regioni, (Emilia Romagna, Liguria, Lombardia, Toscana, Marche, Lazio e Campania). La maggior frequenza dei casi corrisponde alle tradizioni alimentari tipiche di queste aree, dove molti prodotti ittici vengono consumati crudi o poco cotti, o comunque sottoposti a trattamenti non in grado di devitalizzare le larve, come la marinatura. Tutti i casi dove si fa

riferimento alla specie ittica ingerita riportano che il paziente si era alimentato con sardine o acciughe crude marinate (Pampiglione et al., 2002; Moschella et al., 2004; Montalto et al., 2005; Mattiucci et al., 2007b, 2011, 2013; Ugenti et al., 2007; Sola et al., 2011) e nelle scarse indagini dove è stata effettuata l'identificazione molecolare della specie di *Anisakis* è sempre stata repertata *A. pegreffii* (D'amelio et al., 1999; Farjallah et al., 2007; Mattiucci et al., 2007b). La maggior parte dei nematodi sono stati riscontrati a livello gastrointestinale, in un solo caso è stata descritta la localizzazione esofagea (Farjallah et al., 2007); sono stati inoltre riportati casi di localizzazioni extragastrointestinali, quali spleniche, mesenteriche e omentali (Cancrini et al., 1997; Pampiglione et al., 2002; Testini et al., 2003).

Tabella 2.I. Casi di anisakiasi in Italia riportati in letteratura tra il 1996 e il 2013 (da Griglio et al., 2012, modificata). n.r., non rilevato.

	Sesso / Età	Regione	Localizzazione larve	Ingestione prodotto ittico (crudo)	Autore
1	F/40	Puglia (BA)	Stomaco	Qualche h prima	Stallone et al., 1996
2	F/38	Sicilia (CT)	Omento	Abitualmente	Cancrini et al., 1997
3	F/50	Sicilia	Stomaco	10 h prima	Cancrini et al., 1998
4	F/51	Puglia (BA)	Stomaco	Abitualmente	D'amelio et al., 1999
5	F/43	Puglia	Stomaco	Abitualmente	Maggi et al., 2000
6	F/38	Puglia	Feci	24 h prima	Maggi et al., 2000
7	F/34	Puglia	Colon	Sconosciuta	Maggi et al., 2000
8	F/30	Puglia (BA)	Ileo	Saltuariamente	Pampiglione et al., 2002
9	F/22	Molise (CB)	Mesentere	Qualche g. prima	Pampiglione et al., 2002
10	F/54	Puglia (BA)	Omento	Qualche g. prima	Pampiglione et al., 2002
11	M/37	Puglia (BA)	Omento	Occasionalmente	Pampiglione et al., 2002
12	F/44	Molise	Omento	4 gg. prima	Pampiglione et al., 2002
13	F/60	Puglia (BA)	App. epiploica	Abitualmente	Pampiglione et al., 2002
14	F/51	Puglia (BA)	Stomaco	Abitualmente	Pampiglione et al., 2002
15	M/48	Puglia (BR)	Ileo	8 h prima	Pampiglione et al., 2002
16	F/41	Puglia (BR)	Ileo	10 gg. prima	Pampiglione et al., 2002
17	M/56	Puglia (BA)	Stomaco	Qualche h prima	Pampiglione et al., 2002
18	F/86	Puglia (BA)	Milza	Abitualmente	Pampiglione et al., 2002
19	F/56	Puglia (BR)	Stomaco	6 h prima	Pampiglione et al., 2002
10	F/31	Liguria (SV)	Ileo	7 gg. prima	Caramello et al., 2003
21	M/41	Lazio	Ileo	7 gg. prima	Montalto et al., 2005
22	F/37	Lazio	Ileo	Qualche g. prima	Moschella et al., 2005
23	M/33	Toscana (SI)	Digiuno	Qualche g. prima	Pellegrini et al., 2005
24	F/49	n.r.	Esofago	n.r.	Farjallah et al., 2007
25	n.r.	n.r.	Stomaco	Qualche g. prima	Mattiucci et al., 2007
26	M/67	Em. Romagna	Stomaco	8 mesi prima	Pezzulli et al., 2007
27	F/46	Puglia	Stomaco	12 h prima	Ugenti et al., 2007
28	F/61	Puglia	Stomaco	12 h prima	Ugenti et al., 2007
29	F/51	Puglia	Stomaco	2 h prima	Ugenti et al., 2007
30	M/33	Toscana	Digiuno	Qualche g. prima	Marzocco et al., 2009
31	F/49	Puglia	Stomaco	6 h prima	Fumarola et al., 2009
32	F/59	Puglia	Stomaco	Abitualmente	Fumarola et al., 2009
33	n.r.	Puglia (BA)	Stomaco	3 h prima	Zullo et al., 2010
34	F/63	Umbria (TR)	Stomaco	Abitualmente	Sola et al., 2011
35	M/nr	Lazio (VT)	Cieco	2 mesi prima	Mattiucci et al., 2011
36	F/57	Campania (SA)	Stomaco	Qualche g. prima	Bucci et al., 2013
37	M/46	Campania (SA)	Giunz. gastro-esof	Qualche h prima	Bucci et al., 2013
38	n.r.	Campania(BN)	Stomaco	2 gg. prima	Mattiucci et al., 2013
39	n.r.	Abruzzo (PE)	Stomaco	24 h prima	Mattiucci et al., 2013
40	n.r.	Abruzzo (PE)	Stomaco	24 h prima	Mattiucci et al., 2013
41	n.r.	Abruzzo (PE)	Stomaco	1 g. prima	Mattiucci et al., 2013
42	n.r.	Abruzzo(PE)	Stomaco	1 g. prima	Mattiucci et al., 2013
43	n.r.	Lazio (RM)	Stomaco	1 g. prima	Mattiucci et al., 2013
44	n.r.	Toscana (PI)	Stomaco	2 gg. prima	Mattiucci et al., 2013
45	n.r.	Campania(NA)	Stomaco	2-3 h prima	Mattiucci et al., 2013

MATERIALI E METODI

Campionamento

Tra aprile 2006 e novembre 2011 sono stati esaminati, per la ricerca di larve di terzo stadio del genere *Anisakis*, 777 ospiti appartenenti a 10 specie ittiche commerciali: acciuga *Engraulis encrasicolus* (Linnaeus, 1758), nasello *Merluccius merluccius* (Linnaeus, 1758), melù *Micromesistius poutassou* (Risso, 1827), musdea bianca *Phycis blennoides* (Brunnich, 1768), sardina *Sardina pilchardus* (Walbaum, 1792), alaccia *Sardinella aurita* Valenciennes, 1847, lanzardo *Scomber colias* Gmelin, 1789, barracuda mediterraneo *Sphyræna viridensis* Cuvier, 1829, sugarello maggiore *Trachurus mediterraneus* (Steindachner 1868), suro *Trachurus trachurus* (Linnaeus, 1758). I campioni sono stati prelevati da partite di pescato locale provenienti dal Golfo dell'Asinara (Sardegna settentrionale, Figura 2.7) e presenti nel circuito commerciale.

Il numero di esemplari esaminati per ciascuna specie ospite è riportato nella Tabella 2.II.



Figura 2.7. Sito di campionamento.

Tabella 2.II. Numero di campioni esaminati per ciascuna specie ospite.

Ospite	N
<i>Engraulis encrasicolus</i>	38
<i>Merluccius merluccius</i>	96
<i>Micromesistius poutassou</i>	57
<i>Phycis blennoides</i>	46
<i>Sardina pilchardus</i>	252
<i>Sardinella aurita</i>	30
<i>Scomber colias</i>	29
<i>Sphyraena viridensis</i>	140
<i>Trachurus mediterraneus</i>	52
<i>Trachurus trachurus</i>	37

Subito dopo l'arrivo in laboratorio, si è proceduto all'identificazione della specie ospite, quindi ciascun ospite è stato pesato con una bilancia elettronica, con precisione al decimo di grammo, e mediante ittiometro sono state misurate lunghezza totale (estremità del muso - estremità della pinna caudale) e standard (estremità del muso – peduncolo caudale), con precisione al millimetro inferiore. Si è quindi proceduto alla dissezione per la ricerca dei parassiti. I campioni non esaminati immediatamente sono stati conservati a -20° C per essere in seguito sottoposti ad esame parassitologico.

Indagine parassitologica

Dopo aver asportato l'opercolo branchiale è stata praticata un'incisione trasversale anteriormente alle pinne pelviche, proseguendo lungo la linea ventrale sino all'apertura anale. Quindi si è risaliti al di sotto della linea laterale, sino al margine posteriore della cavità branchiale. Una volta rimossa la porzione laterale del pesce è stata messa a nudo la cavità addominale. Dopo accurata ispezione della stessa, i visceri sono stati asportati e posti in una capsula di Petri, ed è stato registrato il peso eviscerato di ciascun ospite.

Il pacchetto intestinale è stato dapprima esaminato ad occhio nudo, e successivamente allo stereomicroscopio. La cavità addominale di ogni esemplare

è stata risciacquata con soluzione fisiologica, e dopo sedimentazione il liquido di lavaggio è stato esaminato allo stereomicroscopio.

La ricerca dei parassiti nella muscolatura è stata effettuata mediante digestione enzimatica secondo i protocolli della Food and Drug Administration (1984) di seguito riportati:

Materiale da laboratorio

- setaccio con maglia 500 μm ;
- agitatore magnetico con piastra riscaldante;

Reagenti chimici

- pepsina 2000 FIP-U/g;
- acido cloridrico 37%;

Metodica

- porre 200 g di muscolo in un beaker contenente 1 l di soluzione 0,5% (peso/volume) di pepsina e 0,0063 M di HCl;
- portare alla temperatura di 37° C e tenere in agitazione per circa due ore. Se al termine delle 2 ore il muscolo non risulta completamente digerito, dopo essere stato risciacquato, trattarlo come precedentemente descritto fino a completa digestione;
- setacciare il materiale indigerito, trasferirlo in un calice contenente acqua di fonte, lasciare sedimentare, e osservare il sedimento allo stereomicroscopio.

Le larve del terzo stadio di *Anisakis* isolate sono state contate e conservate in etanolo 70% per essere successivamente sottoposte ad esame morfologico e biomolecolare.

Identificazione morfologica dei parassiti

Le larve di terzo stadio repertate sono state dapprima osservate in toto allo stereomicroscopio per l'esame dei caratteri macroscopici. Successivamente sono

state diafanizzate in alcol glicerinato, montate in preparati temporanei su vetrino portaoggetti, ed osservate al microscopio ottico per essere identificate come larve Tipo I o Tipo II (*sensu* Berland, 1961).

Analisi molecolare

Prima dell'estrazione del DNA ciascuna larva è stata accuratamente lavata in acqua distillata sterile e frammentata con l'ausilio di un pestello. Per l'estrazione degli acidi nucleici è stato impiegato il kit commerciale della Promega (Wizard Genomic DNA purification Kit, Germania) seguendo le istruzioni fornite dalla casa produttrice. Il DNA estratto è stato conservato a -20° C.

PCR

La regione genomica nucleare ITS (Internal Transcribed Spacer) è stata amplificata con i primers NC5 forward: 5'-GTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATT-3') e NC2 (reverse: 5'-TTAGTTTCTTTTCCTCCGCT-3') (D'Amelio et al., 2000; Pontes et al., 2005).

Tutte le PCR sono state allestite in un volume finale di 50 µl, contenenti 10 µl di DNA (5 ng/µl), 5 U Taq (Eurotaq, Heidelberg, Germania), 2.5 µl di PCR buffer 10x, 10 mM dNTP, 50 mM MgCl₂, e 10 µM di ciascun primer. Un controllo negativo e uno positivo sono stati inclusi in tutte le reazioni di amplificazione realizzate usando il termociclatore Perkin-Elmer Gene Amp PCR System 9700.

Il regime di temperature utilizzato è stato il seguente: denaturazione iniziale di 2 min a 94° C seguiti da 35 cicli di denaturazione a 94° C per 1 min, annealing a 52° C per 1 min, 72°C per 90 sec seguiti da una estensione finale a 72° C per 5 min.

Otto µl dei prodotti di amplificazione sono stati visualizzati e fotografati agli UV (Uvisave Sistem) dopo corsa elettroforetica in gel di agarosio al 2% in TAE 1x, per 30 min a 4 Volt/cm V e successiva colorazione con Bromuro di Etidio (0,24 µg/ml).

RFLP

Per l'identificazione delle specie di *Anisakis* il prodotto della PCR è stato digerito con gli enzimi di restrizione *Hinfi* e *HhaI* secondo i marker genetici definiti da D'Amelio et al. (2000), Pontes et al. (2005) e Fang et al. (2010). La reazione di digestione aveva un volume finale pari a 20 µl. In relazione all'intensità delle bande venivano aggiunti 2, 10 o 17 µl di prodotto della PCR, 1 µl di enzima (10 u/µl), e 2 µl di buffer 10x. La reazione così preparata veniva posta ad incubare a 37°C per 3-4 h.

Sequenziamento

Il prodotto della PCR è stato purificato utilizzando il kit commerciale NucleoSpin Extract (Macherey-Nagel, Duren, Germania) seguendo le istruzioni della casa produttrice. Il sequenziamento è stato eseguito dalla MWG-BIOTECH AG (Ebersberg, Germania). Le sequenze sono state allineate utilizzando il programma CLUSTAL W (Thompson et al., 1994), realizzate con il software BioEdit 7.0.5.2 (Hall, 1999) e depositate in GenBank (GB# KF486846-KF486883).

I cromatogrammi delle sequenze di *Anisakis* Tipo I sono state analizzate utilizzando FinchTV 1.4.0 (Geospiza, Inc.; Seattle, WA, USA; <http://www.geospiza.com>) e confrontate con quelle di *A. simplex* s.s. (GB# JN968792) e *A. pegreffii* (GB# EU718479) disponibili in GenBank per evidenziare l'eventuale presenza di genotipi ibridi.

Per realizzare l'analisi filogenetica, la specie *Pseudoterranova decipiens* (Krabbe, 1878), la cui sequenza è disponibile in GenBank (GB# AB277824), è stata inclusa come outgroup allo scopo di studiare il legame filogenetico con questi individui e testare la monofilia di *Anisakis* spp. Sono state inoltre inserite le sequenze di *A. simplex* s.s. (GB# JN968792), *A. pegreffii* (GB# EU718479) e *A. physeteris* (GB# JX523714).

Per il calcolo del modello evolutivo (Best Probabilistic model) delle sequenze con il criterio Akaike (AIC) è stato utilizzato il programma JModeltest

0.1.1 (Posada, 2008). JModelTest ha indicato come più adeguato al dataset di sequenze analizzato, il modello HKY+I 6-rates. L'analisi di maximum likelihood è stata effettuata utilizzando il programma PhyML 3.0 (Guindon e Gascuel, 2003). È stato impostato un modello evolutivo six-rates custom che consente di stimare le proporzioni dei siti invariabili e la distribuzione di gamma. È stato utilizzato l'algoritmo SPR (subtree pruning and regrafting) con 1.000 repliche di bootstrap.

Le relazioni genetiche tra individui sono state valutate con il programma MEGA 5 (Tamura et al., 2011) utilizzando l'algoritmo neighbourjoining (NJ), ed escludendo dall'analisi le inserzioni/delezioni (indels) di probabile scarso valore filogenetico (Redd e Stoneking, 1999). Le relazioni evoluzionistiche sono state calcolate con il modello a due parametri di Kimura, con un bootstrap di 1000 repliche. Sia per l'albero ML che per quello NJ i nodi con percentuale di bootstrap <70% sono stati considerati non supportati statisticamente (Hills e Bull, 1993).

Analisi statistica

Per ogni esemplare ospite è stato valutato il numero di larve di *Anisakis* Tipo I e Tipo II (successivamente identificate a livello specifico) presenti, al fine di calcolare gli indici proposti da Bush et al. (1997):

- Prevalenza, numero di individui di una specie ospite infestati da una specie parassitaria ÷ numero totale degli esemplari della specie ospite esaminati.
- Intensità di infestazione, numero di individui di una specie parassitaria in ogni individuo ospite.
- Intensità media, numero totale degli individui di una determinata specie parassitaria in un campione ÷ numero degli individui ospiti infestati da quella specie nell'interno del campione.

Le elaborazioni statistiche sono state effettuate mediante foglio di calcolo e con il programma Quantitative Parasitology 3.0 (Reiczigel e Rózsa, 2005). In particolare, gli intervalli di confidenza dell'intensità media e della prevalenza sono stati calcolati rispettivamente con il metodo esatto di Sterne ed il bootstrap

di Efron-Tibshirani, e le loro differenze valutate rispettivamente con il test esatto di Fisher e il bootstrap test.

RISULTATI

Duecentodiciotto dei 777 pesci esaminati sono risultati infestati da L₃ di *Anisakis* sp. (prevalenza totale = 28,1%, intensità media totale = 5,9); delle 1.286 larve repertate 1.272 (99%) sono state identificate come di Tipo I, e 14 come di Tipo II.

Analisi molecolare

RFLP

Quattrocentocinquanta larve di *Anisakis* sp. (436 del Tipo I e 14 del Tipo II) sono state esaminate con la metodica PCR-RFLP, allo scopo di identificarle a livello di specie sulla base di specifici patterns di restrizione.

L'amplificazione della regione ITS (ITS-1, 5.8S e ITS-2) del DNA ribosomiale (rDNA) con i primers NC5 ed NC2 ha prodotto un frammento di circa 1.000 bp (Figura 2.8). La digestione con i due enzimi di restrizione *Hinf*I e *Hha*I ha prodotto per ciascun enzima due differenti patterns per le larve di Tipo I (Figura 2.9) e due differenti patterns per quelle di Tipo II (Figura 2.10). In particolare, la digestione con l'enzima *Hinf*I ha determinato tre bande di 370, 300, 250 bp, che identificano la specie *A. pegreffii*, e tre bande di 380, 290, 270 bp identificative di *A. physeteris*. Gli stessi campioni, digeriti con l'enzima *Hha*I hanno prodotto due bande di 550 e 450 bp e due bande di 510 e 390 bp che identificano rispettivamente *A. pegreffii* e *A. physeteris*. Non sono stati riscontrati genotipi ibridi tra *A. simplex* (s.s.) ed *A. pegreffii*.



Figura 2.8. Corsa elettroforetica della PCR della regione ITS. M, marker; 1, controllo positivo; 12, controllo negativo.

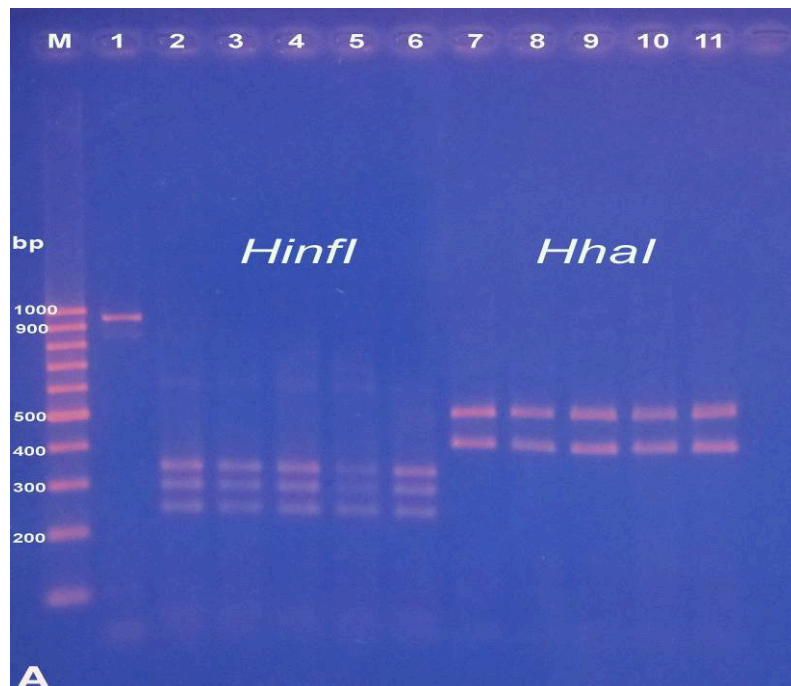


Figura 2.9. Corsa elettroforetica della digestione del prodotto di PCR ottenuto da larve di Tipo I: pattern di restrizione per *A. pegreffii* con gli enzimi *Hinfl* (2-6) e *HhaI* (7-11). M, marker; 1, campione non digerito.

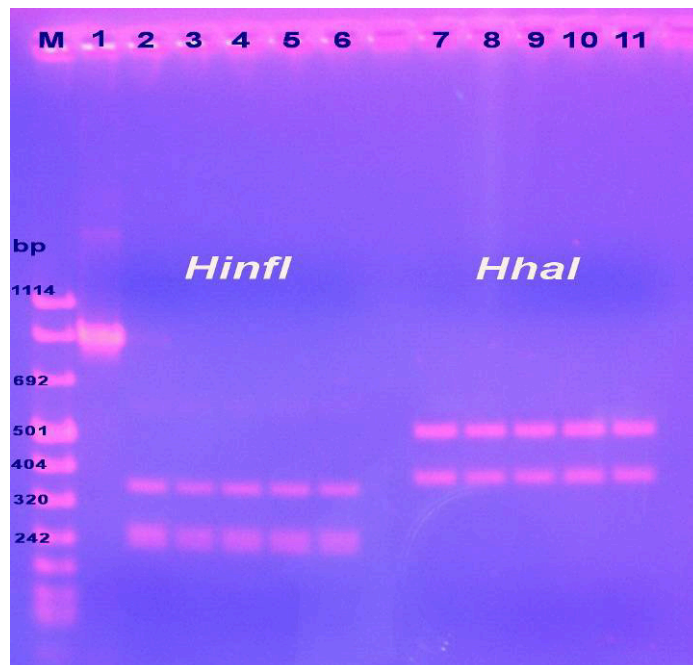


Figura 2.10. Corsa elettroforetica della digestione del prodotto di PCR ottenuto da larve di Tipo II: patterns di restrizione per *A. physeteris* con gli enzimi *Hinfl* (2-6) e *HhaI* (7-11). M, marker; 1, campione non digerito.

Sequenziamento

Il rDNA della regione ITS isolato da 38 larve di *Anisakis* (24 di Tipo I e 4 di Tipo II) è stato sequenziato ed esaminato. Coerentemente con i risultati della PCR-RFLP, l'analisi delle sequenze e dei cromatogrammi ha identificato le larve di Tipo I come appartenenti alla specie *A. pegreffii*, e quelle di Tipo II come appartenenti alla specie *A. physeteris* e non ha rilevato la presenza di genotipi ibridi.

Utilizzando *P. decipiens* come outgroup, l'analisi di maximum likelihood (ML) ha evidenziato due cluster principali di individui (Figura 2.11) supportati da alti valori di bootstrap. Il cluster A è costituito da individui appartenenti al Tipo II le cui sequenze sono riconducibili ad *A. physeteris*, il cluster B raggruppa individui appartenenti al Tipo I, le cui sequenze sono riconducibili alla specie *A. pegreffii*.

L'analisi di neighbourjoining è coerente con quella di maximum likelihood (ML), e mostra sia la stessa topologia degli alberi che gli stessi nodi altamente supportati per i due gruppi individuati (per valori di bootstrap, vedere Figura 2.11).

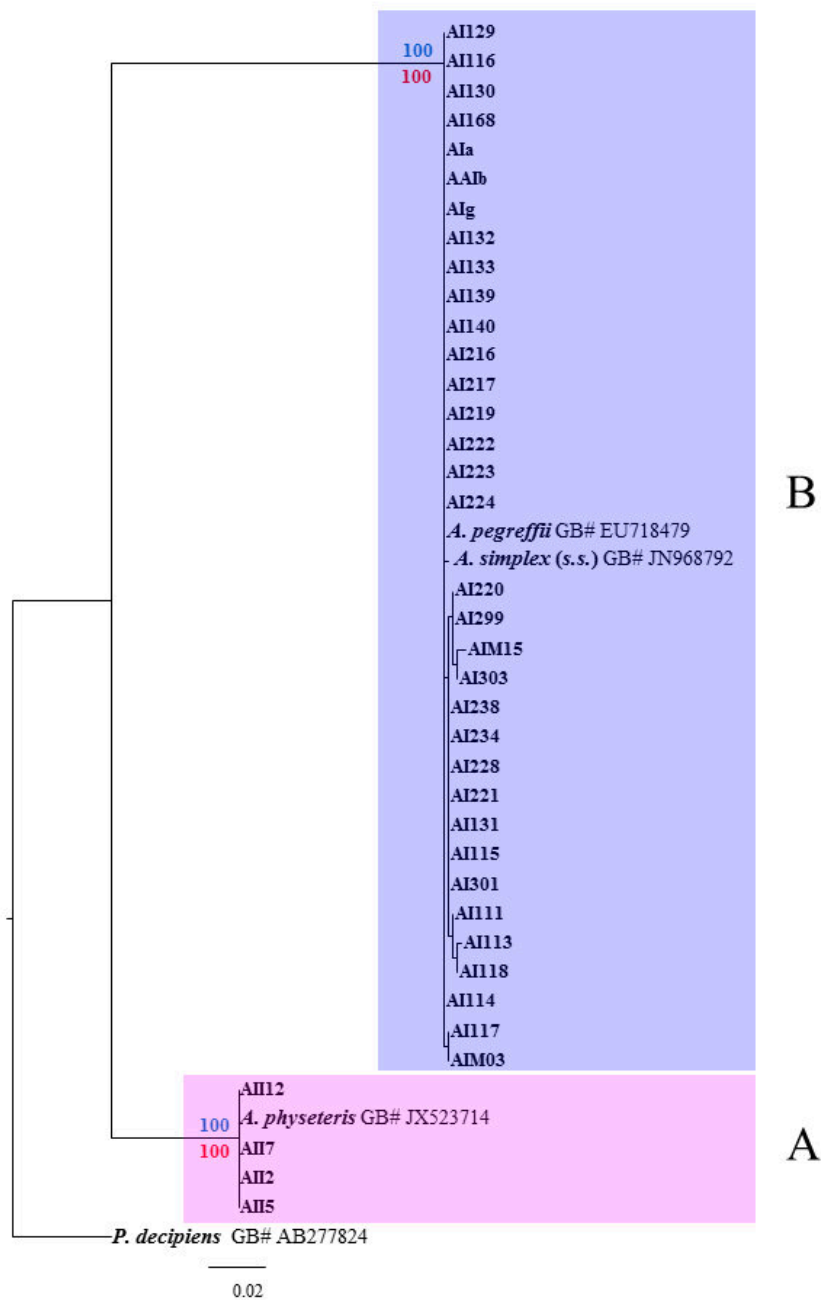


Figura 2.11. Albero ML, la radice è rappresentata dall'outgroup *P. decipiens*. La scala rappresenta il numero di sostituzioni per sito. Il supporto dei cluster principali (espresso come valore di bootstrap) è indicato sopra i nodi. I valori di bootstrap ottenuti per l'analisi NJ sono indicati sotto i nodi. AI: prefisso per larve di Tipo I di *Anisakis*; All: prefisso per larve di Tipo II di *Anisakis*.

Analisi statistica

L'intensità media di infestazione è risultata rispettivamente di 5,9 e 1,4 per *A. pegreffii* e *A. physeteris*.

Il 95 % dei campioni infestati da larve di *Anisakis* spp. presentavano esclusivamente infestazione da *A. pegreffii*, l'1% esclusivamente da *A. physeteris* (due campioni appartenenti alla specie *M. poutassou*), mentre 8 campioni (4%) presentavano infestazione mista (4 *M. poutassou*, 2 *T. trachurus*, 1 *M. merluccius*, 1 *S. colias*).

I livelli di infestazione di *Anisakis* spp. sono riportati nella Tabella 2.III e Figura 2.12. *A. physeteris* è stato repertato in 4 delle 10 specie: *M. poutassou*, *T. trachurus*, *S. colias*, *M. merluccius*, mentre *P. blennoides* è stata l'unica specie risultata sempre negativa.

Ad eccezione di *P. blennoides* (sempre negativo) e *S. aurita*, la prevalenza di *A. pegreffii* in ciascuna specie ospite era significativamente più elevata di quella di *A. physeteris*, mentre per quanto riguarda l'intensità media di infestazione solo in *T. trachurus* sono state rilevate differenze significative (Tabella 2.III).

La Figura 2.12 mostra i livelli di infestazione di *A. pegreffii* e *A. physeteris* per ciascuna specie ospite, ordinati in base alle prevalenze, con il relativo intervallo di confidenza del 95%. Si nota come le 4 specie maggiormente infestate da *A. pegreffii* (*T. trachurus*, *S. colias*, *M. poutassou*, *M. merluccius*) siano le uniche infestate anche da *A. physeteris*, anche se per questa specie l'ospite maggiormente infestato risulta essere *M. poutassou*.

Tabella 2.III. Livelli di infestazione di *Anisakis* spp. negli ospiti esaminati. P%, prevalenza; Im, Intensità media di infestazione; int I, intervallo di intensità di infestazione; * p<0.05; - indeterminato.

Specie ospite	<i>Anisakis pegreffii</i>			<i>Anisakis physeteris</i>		
	P%	Im	int I	P%	Im	int I
<i>E. encrasicolus</i>	65,8% *	2,8	1-5	0,0% *	-	-
<i>M. merluccius</i>	37,5% *	1,3	1-3	1,0% *	1,0	1-1
<i>M. poutassou</i>	66,7% *	3,9	1-50	10,5% *	1,5	1-4
<i>P. blennoides</i>	0,0%	-	-	0,0%	-	-
<i>S. pilchardus</i>	13,1% *	1,2	1-3	0,0% *	-	-
<i>S. aurita</i>	13,3%	1,0	1-1	0,0%	-	-
<i>S. colias</i>	96,6% *	15,1	1-46	3,4% *	1,0	1-1
<i>S. viridensis</i>	5,7% *	2,3	1-8	0,0% *	-	-
<i>T. mediterraneus</i>	13,5% *	2,1	1-5	0,0% *	-	-
<i>T. trachurus</i>	100,0% *	13,6 *	1-12	5,4% *	1,5 *	1-2
Tot	27,8%	5,9	1-50	1,3%	1,4	1-4

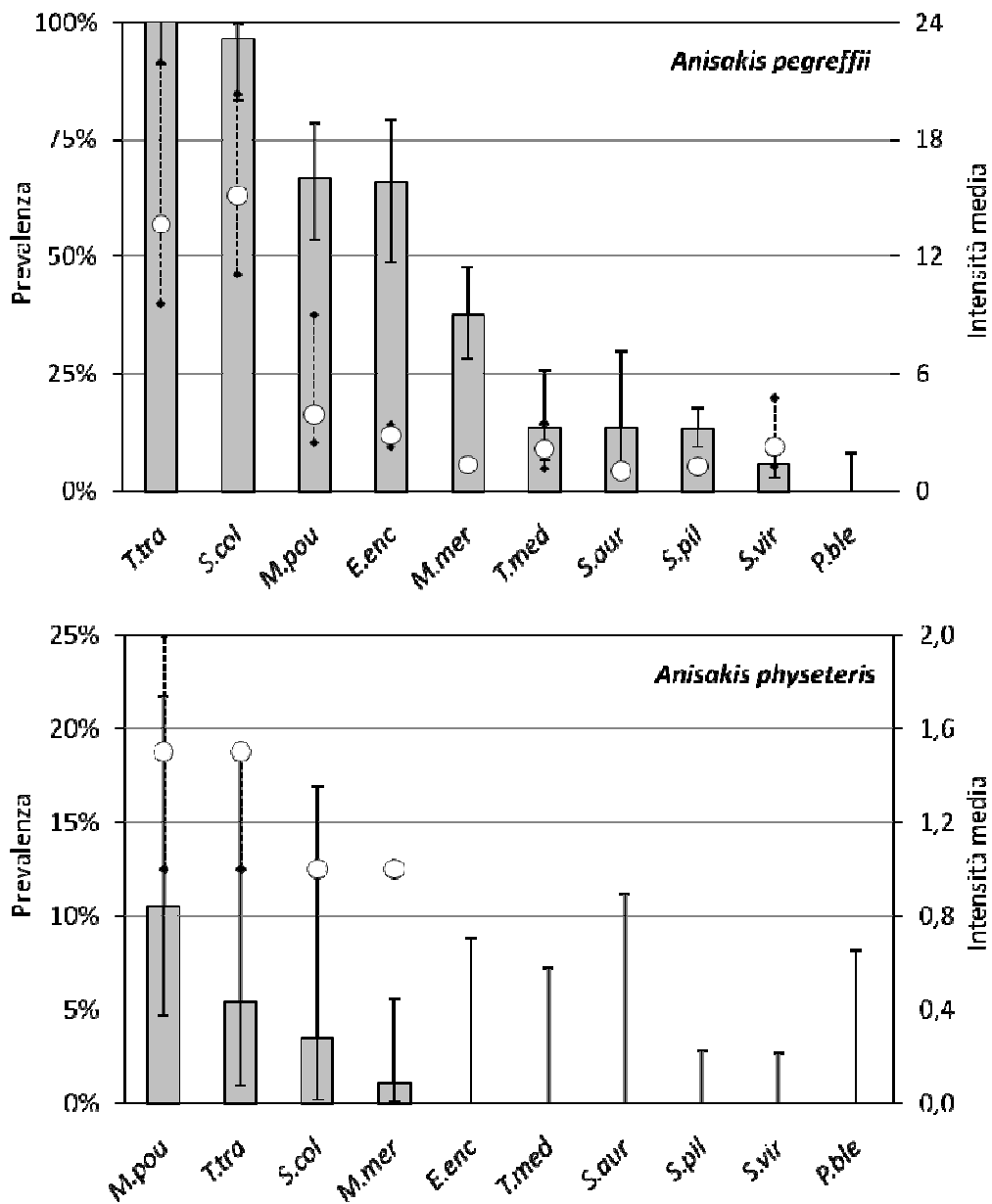


Figura 2.12. Livelli di infestazione di *Anisakis* spp. nelle specie ospite esaminate. E.enc, *Engraulis encrasicolus*; M.mer, *Merluccius merluccius*; M.pou, *Micromesistius poutassou*; P.ble, *Phycis blennoides*; S.pil, *Sardina pilchardus*; S.aur, *Sardinella aurita*; S.col, *Scomber colias*; S.vir, *Sphyraena viridensis*; T.med, *Trachurus mediterraneus*; T.tra, *Trachurus trachurus*. █ prevalenza; ○ intensità media di infestazione; linee, intervallo di confidenza al 95%.

Le Tabelle 2.IV e 2.V riportano il confronto di prevalenza ed intensità media di infestazione di *Anisakis* spp. tra le diverse specie ospite. Per quanto riguarda *A. pegreffii*, la sua prevalenza nelle cinque specie ospite maggiormente infestate ha valori significativamente più alti rispetto a quelli nelle altre specie ospite (eccetto *S. colias* vs. *T. trachurus* e *E. encrasicolus* vs. *M. poutassou*). In *P. blennoides* (sempre negativo) ha prevalenza significativamente più bassa rispetto a quella in tutte le altre specie, eccetto *S. viridensis*, la quale mostra prevalenze significativamente più basse rispetto a *S. pilchardus*. L'intensità di infestazione di *A. pegreffii* in *T. trachurus* e *S. colias* è sempre significativamente più alta che in tutte le altre specie; in *E. encrasicolus* è significativamente più alta rispetto al *M. merluccius* e agli altri due clupeiformi (*S. pilchardus* e *S. aurita*), in *M. merluccius* *A. pegreffii* mostra una intensità di infestazione più alta che in *S. aurita*.

Per quanto riguarda *A. physeteris*, la sua prevalenza in *M. poutassou* è significativamente più alta che in tutte le altre specie con un sufficiente numero di campioni (affinché il test sia significativo), e con livelli di infestazione più bassi (o nulli) (*M. merluccius*, *P. blennoides*, *S. pilchardus*, *S. viridensis*, *T. mediterraneus*). La prevalenza in *T. trachurus* è significativamente più alta che in *S. pilchardus* e *S. viridensis*.

Non sono state rilevate differenze significative relative all'intensità di infestazione di *A. physeteris*.

Tabella 2.IV. Confronto delle infestazioni da *Anisakis pegreffii* tra le specie ospite esaminate. Per le abbreviazioni vedere figura 2.12. * $p < 0.05$; - indeterminato.

Im / P%	<i>T.tra</i>	<i>S.col</i>	<i>M.pou</i>	<i>E.enc</i>	<i>M.mer</i>	<i>T.med</i>	<i>S.aur</i>	<i>S.pil</i>	<i>S.vir</i>	<i>P.ble</i>
<i>T.tra</i>	\		*	*	*	*	*	*	*	*
<i>S.col</i>		\	*	*	*	*	*	*	*	*
<i>M.pou</i>	*	*	\		*	*	*	*	*	*
<i>E.enc</i>	*	*		\	*	*	*	*	*	*
<i>M.mer</i>	*	*		*	\	*	*	*	*	*
<i>T.med</i>	*	*				\				*
<i>S.aur</i>	*	*		*	*		\			*
<i>S.pil</i>	*	*		*				\	*	*
<i>S.vir</i>	*	*							\	
<i>P.ble</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	\

Tabella 2.V. Confronto delle infestazioni da *Anisakis physeteris* tra le specie ospite esaminate. Per le abbreviazioni vedere figura 2.12. * $p < 0.05$; - indeterminato.

Im / p%	<i>M.pou</i>	<i>T.tra</i>	<i>S.col</i>	<i>M.mer</i>	<i>E.enc</i>	<i>T.med</i>	<i>S.aur</i>	<i>S.pil</i>	<i>S.vir</i>	<i>P.ble</i>
<i>M.pou</i>	\			*		*		*	*	*
<i>T.tra</i>		\						*	*	
<i>S.col</i>			\							
<i>M.mer</i>				\						
<i>E.enc</i>	-	-	-	-	\					
<i>T.med</i>	-	-	-	-	-	\				
<i>S.aur</i>	-	-	-	-	-	-	\			
<i>S.pil</i>	-	-	-	-	-	-	-	\		
<i>S.vir</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	\	
<i>P.ble</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	\

Anisakis nel muscolo

La maggior parte delle larve di *Anisakis* spp. repertate erano localizzate nella cavità celomatica degli ospiti: il 95% di *A. pegreffii* e il 100% di *A. physeteris* (Tabella 2.VI). *Sardinella aurita* e *T. mediterraneus* hanno la percentuale più alta di *A. pegreffii* nel muscolo (rispettivamente il 50% e 40% delle larve) anche se il numero totale delle larve ed i livelli di infestazione sono relativamente bassi. Al contrario, le tre specie con i più alti livelli di infestazione (*T. trachurus*, *S. colias*, *M. poutassou*) hanno la percentuale più bassa di larve nel muscolo (se si escludono *P. blennoides* e *S. viridensis*, il cui muscolo è risultato sempre negativo). Il 6,3 % dei pesci esaminati (49 campioni) presentavano *A. pegreffii* nel muscolo (22,5% dei pesci infestati) (Tabella 2.VI). In particolare in tre specie ospite (*T. trachurus*, *S. colias*, *M. poutassou*) la prevalenza nel muscolo era superiore al 10% e solo in tre specie (*S. pilchardus*, *S. viridensis*, *P. blennoides*) era inferiore al 5% (Tabella 2.VI e Figura 2.13).

L'intensità media di infestazione nel muscolo era relativamente bassa e simile in tutte le specie, con un intervallo da 1 a 2 (con i valori più alti in *T. mediterraneus*, *S. colias*, *E. encrasicolus*). Dei 49 pesci positivi per *A. pegreffii* nel muscolo, la maggior parte (82%) avevano il parassita anche in cavità celomatica, e solo 9 campioni (18%) presentavano solo un'infestazione muscolare.

La Tabella 2.VII mostra il confronto tra l'infestazione di *A. pegreffii* nel muscolo delle diverse specie ospite. La prevalenza in *T. trachurus* era sempre più alta che in tutte le altre specie, eccetto in *S. colias*, e la prevalenza in quest'ultima specie era significativamente più alta che nelle quattro specie meno infestate, mentre in *M. poutassou* era significativamente più alta solo rispetto alle tre specie meno infestate. La prevalenza nel muscolo di *S. viridensis* era significativamente più bassa rispetto a tutte le altre specie infestate, eccetto *P. blennoides*. L'intensità di infestazione nel muscolo di *E. encrasicolus* era significativamente più alta che in tutte le altre specie ospite, eccetto *S. colias* e *T. mediterraneus*.

Tabella 2.VI. Presenza e ripartizione di *Anisakis* spp. nel muscolo delle specie esaminate. Nm, numero degli ospiti infestati nel muscolo; Pm%, prevalenza nel muscolo; MIm, intensità media nel muscolo; NL, numero totale delle larve; NLm, numero totale delle larve nel muscolo; %m, percentuale di larve nel muscolo.

Specie ospite	Nm	Pm%	MIm	<i>Anisakis pegreffii</i>			<i>Anisakis physeteris</i>		
				NL	NLm	%m	NL	NLm	%m
<i>T. trachurus</i>	14	37,8%	1,1	505	16	3,2%	3	0	-
<i>S. colias</i>	6	20,7%	1,7	423	10	2,4%	1	0	-
<i>M. poutassou</i>	8	14,0%	1,0	148	8	5,4%	9	0	-
<i>E. encrasicolus</i>	3	7,9%	2,0	71	6	8,5%	0	0	-
<i>T. mediterraneus</i>	4	7,7%	1,5	15	6	40,0%	0	0	-
<i>S. aurita</i>	2	6,7%	1,0	4	2	50,0%	0	0	-
<i>M. merluccius</i>	5	5,2%	1,0	47	5	10,6%	1	0	-
<i>S. pilchardus</i>	7	2,8%	1,0	41	7	17,1%	0	0	-
<i>S. viridensis</i>	-	-	-	18	0	-	0	0	-
<i>P. blennoides</i>	-	-	-	0	0	-	0	0	-
Tot	49	6,3%	1,2	1272	60	4,7%	14	0	-

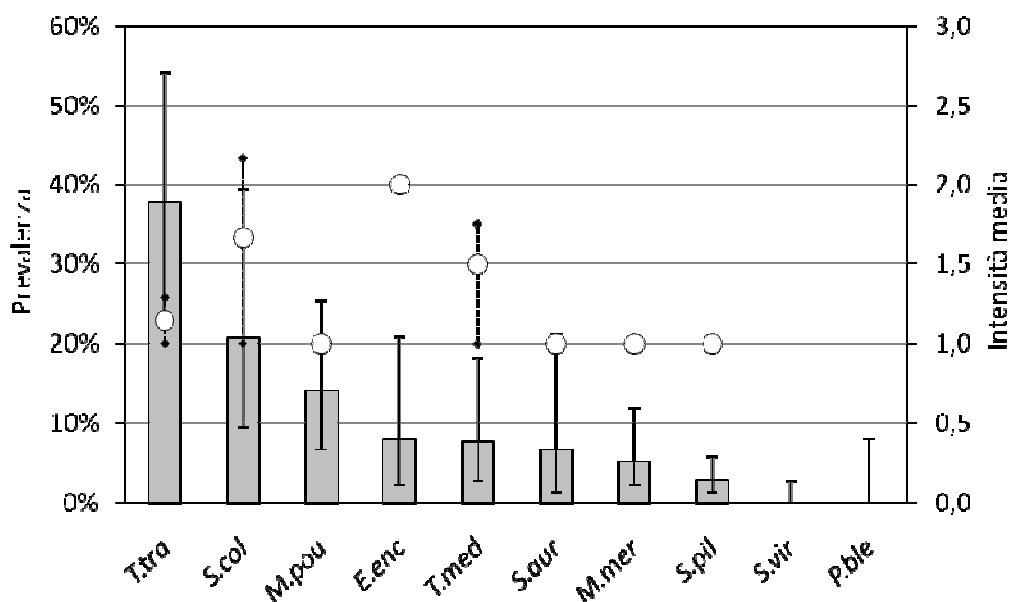


Figura 2.13. Livelli di infestazione da *Anisakis pegreffii* nel muscolo delle specie ospite esaminate. Per abbreviazioni vedere figura 2.12. █ prevalenza; ○ intensità media di infestazione; linee, intervallo di confidenza al 95%.

Tabella 2.VII. Confronto delle infestazioni da *Anisakis pegreffii* nel muscolo tra le specie ospite esaminate. Per le abbreviazioni vedere figura 2.12. * p<0.05; - indeterminato.

Im / P%	<i>T.tra</i>	<i>S.col</i>	<i>M.pou</i>	<i>E.enc</i>	<i>T.med</i>	<i>S.aur</i>	<i>M.mer</i>	<i>S.pil</i>	<i>S.vir</i>	<i>P.ble</i>
<i>T.tra</i>	\		*	*	*	*	*	*	*	*
<i>S.col</i>		\					*	*	*	*
<i>M.pou</i>			\					*	*	*
<i>E.enc</i>			*	\					*	
<i>T.med</i>					\				*	
<i>S.aur</i>				*		\			*	
<i>M.mer</i>				*			\		*	
<i>S.pil</i>				*				\	*	
<i>S.vir</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	\	
<i>P.ble</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	\

DISCUSSIONE

Il presente lavoro rappresenta il primo contributo allo studio della sistematica molecolare e dell'epidemiologia di *Anisakis* spp. in specie ittiche commerciali pescate nelle acque del Nord Sardegna.

I risultati dell'indagine molecolare confermano gli studi precedentemente realizzati nel Mar Mediterraneo occidentale, infatti, i pesci risultano infestati dalle due principali specie del genere *Anisakis* di quest'area: *A. pegreffii* e *A. physeteris* (Mattiucci e Nascetti, 2008). Gli alti livelli di infestazione di *A. pegreffii*, significativamente più alti rispetto a quelli di *A. physeteris*, sia nelle specie pelagiche che in quelle demersali, confermano che *A. pegreffii* è la specie dominante del Mar Mediterraneo (Mattiucci e Nascetti, 2008). La predominanza di questa specie nell'area è probabilmente da imputarsi all'elevata presenza dei suoi ospiti definitivi, i delfini *Tursiops truncatus* e *Stenella coeruleoalba* (Mattiucci e Nascetti, 2008). I bassi livelli di infestazione registrati per *A. physeteris* confermano che questa specie è poco comune nei pesci, e che i suoi ospiti preferenziali possano essere calamari ed altri invertebrati (Mattiucci e Nascetti, 2008). La bassa frequenza di questa specie sembra inoltre legata alla minor presenza nel Mar Mediterraneo del suo ospite definitivo, il capodoglio *Physeter macrocephalus* (Linnaeus, 1758) (Mattiucci e Nascetti, 2008).

Nella presente indagine non sono stati repertati ibridi tra *A. pegreffii* e *A. simplex* (s.s.), riscontrati da alcuni autori in diverse specie ittiche pescate nel Mar Mediterraneo, quali *E. encrasicolus*, *M. merluccius*, *M. poutassou*, *Pagellus erythrinus* (Linnaeus, 1758), *S. colias*, *Scomber scombrus* Linnaeus, 1758, *T. mediterraneus*, *Trachurus picturatus* (Bowdich, 1825), *T. trachurus* (Mattiucci et al., 2004, 2010; Farjallah et al., 2008a,b; Meloni et al., 2011; Cavallero et al., 2012; Chaligiannis et al., 2012).

Anisakis simplex (s.s.) è presente soprattutto tra il Circolo Polare Artico ed il 35° Parallelo Nord, con limite meridionale nell'Atlantico centro-orientale nello Stretto di Gibilterra, attraverso il quale, la specie può raggiungere con pesci

pelagici il Mare di Alboran e altre aree del Mar Mediterraneo occidentale (Mattiucci et al., 2007a). Aree di simpatria tra *A. simplex* (s.s.) e *A. pegreffii* sono state individuate lungo le coste Atlantiche della Spagna e del Portogallo (Abollo et al., 2001a,b; Mattiucci et al., 2004, 2007a) e nel Mar di Alboran (Mattiucci et al., 2004, 2007). Gli ibridi tra *A. simplex* (s.s.) e *A. pegreffii* sono stati repertati con maggiore frequenza in pesci provenienti dalle aree in prossimità dello Stretto di Gibilterra (Mar di Cadice e il Mar di Alboran) dove la fauna dell'Oceano Atlantico e del Mar Mediterraneo ha più probabilità di mescolarsi (Abollo et al., 2003). Da rilevare il riscontro di genotipi ibridi anche lungo le coste della Tunisia e della Sardegna (Farjallah et al., 2008; Meloni et al., 2011; Cavallero et al., 2012) che ne estendono i limiti di distribuzione.

Il mancato riscontro di genotipi ibridi nel presente studio può essere spiegata con la conformazione semi chiusa del Golfo dell'Asinara e con i complessi flussi delle correnti superficiali del Mar Mediterraneo occidentale (Pracchi e Terrosu-Asole, 1971) che limitano gli scambi con le aree limitrofe, in parte influenzate dalle correnti atlantiche (Millot e Taupier-Letage, 2005). Questi risultati sono peraltro confermati da quanto riportato da Meloni et al. (2011) che riscontrano genotipi ibridi lungo tutte le coste della Sardegna, eccetto che in quelle settentrionali. Il Golfo dell'Asinara è parte di quel settore bio-geografico del Mar Mediterraneo occidentale indicato da Bianchi (2007) come "Mar delle Baleari-Mar di Sardegna", che presenta marcate differenze ecologiche con il settore meridionale "Mar di Alboran" e "Coste dell'Algeria e della Tunisia settentrionale". In queste aree del Mediterraneo meridionale, le correnti provenienti dall'Algeria che scorrono verso Est lungo le coste del Nord Africa (Rio et al., 2007), possono agire come una barriera alla dispersione nord-sud nel Canale di Sardegna. L'influenza delle correnti marine come barriere idrodinamiche alla diffusione di specie nel Mar Mediterraneo è stata suggerita anche per le popolazioni dei molluschi *Patella ferruginea* Gmelin, 1791 (Casu et al., 2011) e *Pinna nobilis* Linnaeus, 1758 (Sanna et al., 2013), la cui diversa

strutturazione genetica tra il Mar Mediterraneo nord-occidentale e le coste settentrionali dell'Africa è possibile conseguenza della Corrente Algerina.

Diversi lavori sono stati pubblicati sulle caratteristiche molecolari di *Anisakis* spp. in tutto il mondo e nel Mar Mediterraneo, ma molti di questi non riportano chiaramente i livelli di infestazione per le singole specie di *Anisakis* nelle diverse specie ospite. Anche se in linea di massima i risultati della presente ricerca sono simili a quelli riportati in letteratura, alcuni meritano particolare attenzione.

Uno dei risultati più rilevanti è l'elevata prevalenza di *A. pegreffii* nei piccoli pesci pelagici *E. encrasicolus*, *S. pilchardus* e *S. aurita*. Relativamente ad *E. encrasicolus*, simili livelli di infestazione sono stati registrati nell'Adriatico centro-orientale da Mladineo et al. (2012), mentre quelli riscontrati in *S. pilchardus* e *S. aurita* sono i più elevati per queste specie.

Esistono diversi dati (e opinioni) contrastanti sull'infestazione da *Anisakis* sp. nei piccoli pelagici, che hanno tra l'altro notevole importanza nei riguardi della sicurezza alimentare e pertanto un rilevante impatto commerciale. Nelle acque della Sardegna Angelucci et al. (2011) e Meloni et al. (2011) hanno registrato prevalenze relativamente alte sia in *E. encrasicolus* che in *S. pilchardus*. Secondo Rello et al. (2009) prevalenze le più elevate di *Anisakis* sp. in *E. encrasicolus* si riscontrano in Liguria e nel Golfo di Cadice (Oceano Atlantico Orientale), in virtù dell'abbondante popolazione di cetacei in entrambe le aree, mentre Cavallero e D'Amelio (2012) e Fioravanti et al. (2012) riportano valori notevolmente più bassi in campioni di acciughe provenienti dal Tirreno centro-orientale e dal Mar Ligure. In contrasto con quanto riportato nella presente indagine, Rello et al. (2008) suggeriscono *Hysterothylacium aduncum* (Rudolphi, 1802) come l'unico nematode presente in sardine pescate nelle coste meridionali e orientali della Spagna, e risultati simili sono riportati da Kijewska et al. (2009) in campioni delle coste nord-occidentali dell'Africa tra il Marocco e la Mauritania, e da Gutierrez-Galindo et al. (2010) in acque spagnole.

Relativamente alle altre specie, nelle acque della Sardegna , Angelucci et al. (2011) e Meloni et al. (2011) riportano dati quantitativi, ma alcuni ospiti da loro esaminati sono stati identificati solo a livello di genere, ed in alcuni casi il numero di individui per ciascuna specie ospite del campione era troppo basso (meno di 20); quindi, le uniche specie realmente comparabili con quelle del presente lavoro sono *M. merluccius*, *T. mediterraneus* e *T. trachurus*, i cui livelli di infestazione sono comparabili con quelli riportati nel presente studio. Nelle acque italiane Manfredi et al. (2000), Costa et al. (2008) e Cavallero e D'Amelio (2012) riportano dati quantitativi relativi rispettivamente al Mar Ligure, al Mar Tirreno e alle acque della Sicilia. Le specie ospite esaminate in comune con quelle della presente indagine hanno livelli di infestazione simili, fatta eccezione per i valori più bassi registrati in *M. merluccius* da Costa et al. (2008) e per alcune discrepanze nei dati relativi a *Trachurus* spp., fatto che può essere dovuto alla difficoltà nell'identificare le diverse specie appartenenti a questo genere.

Nelle altre aree del Mar Mediterraneo e nelle acque prossime dell'Atlantico orientale, Abollo et al. (2001) e Valero et al. (2006a) hanno descritto più alti livelli di infestazione da *A. pegreffii* e *Anisakis simplex* s.l. (e *A. physeteris*) in *M. merluccius* dell'Oceano Atlantico nord e centro orientale. Valero et al. (2000) riportano più bassi valori di infestazione da *A. pegreffii* e *A. physeteris* in *M. poutassou* del Mar di Alboran; nella stessa specie ospite Abollo et al. (2001) riportano simili livelli di infestazione da *A. pegreffii* nell'Oceano Atlantico Nord-orientale, mentre non rilevano la presenza di *A. physeteris*. Farjallah et al. (2006) e Valero et al. (2006) riportano infestazione rispettivamente da *A. pegreffii* e *A. physeteris*, in *P. blennoides* delle coste mediterranee della Tunisia e della Spagna meridionale, mentre nel presente lavoro questa specie ospite è risultata sempre negativa. Gli alti livelli di infestazione da *A. pegreffii* in *T. trachurus* qui osservati sono confermati da Abollo et al. (2001b) in specie ittiche provenienti dalla Galizia, mentre Abollo et al. (2003) e Gutierrez-Galindo et al. (2010) riportano valori più bassi (o nulli) di *A. pegreffii* in questa specie ospite proveniente dalle

acque atlantiche spagnole, anche se Abollo et al. (2003) segnalano valori simili per *A. symplex* (s.s.).

Riassumendo, i dati epidemiologici di *Anisakis* spp. relativi al Mar Mediterraneo e all'Oceano Atlantico orientale sono ancora poco chiari, frammentari e spesso contrastanti: ulteriori studi sono necessari per colmare l'assenza di informazioni e per raccogliere in un quadro più chiaro i dati presenti nei numerosi lavori e relazioni scientifiche (letteratura grigia), spesso ottenuti anche con metodologie diverse, in relazione soprattutto al grande impatto che questo parassita ha sull'economia e sulla sicurezza alimentare.

La maggior parte delle larve di terzo stadio di *Anisakis* spp. sono state repertate nella cavità addominale degli ospiti, libere o incapsulate nei visceri, e solo una piccola percentuale (4,7%) nel muscolo (6,3% del totale dei pesci). Larve di *Anisakis* sono state repertate nel muscolo di tutte le specie ospite esaminate nel presente lavoro, eccetto *P. blennoides* (sempre negativo) e *S. viridensis*. *Trachurus trachurus*, *S. colias* e *M. poutassou* sono le specie con le più alte prevalenze di larve di *Anisakis* nel muscolo (rispettivamente 37,8%, 20,5% e 14%), e questo dato è in accordo con quanto riportato da Abollo et al. (2001), che ha descritto la presenza di larve nel muscolo di *T. trachurus* e *M. poutassou*, mentre Valero et al. (2000) riportano solo una larva ($p = 0,33\%$) nel muscolo di 301 *M. poutassou* esaminati. Nella stessa regione, Valero et al. (2006b) hanno trovato larve di *Anisakis* nel muscolo di *P. blennoides*, risultato sempre negativo in questo studio. Angelucci et al. (2011) hanno repertato larve di *Anisakis* nel muscolo di cinque specie di pesci dalle acque della Sardegna (*Trachurus* spp., *E. encrasicolus*, *M. merluccius*, *M. poutassou* e *S. scombrus*), e questi dati sono in parte confermati dai risultati del presente studio, anche se le prevalenze qui riportate sono leggermente inferiori, ad eccezione di quelle relative a *Trachurus* spp. *Anisakis pegreffii* è risultata l'unica specie presente nel muscolo dei pesci esaminati, e non sono state riscontrate larve di *A. physeteris*. Questi dati confermano che *A. pegreffii* è l'unica specie individuata a livello molecolare come

agente di anisakiasi umana nel Mediterraneo (D'Amelio et al., 1999; Farjallah et al., 2007; Mattiucci et al., 2007b).

CAPITOLO 3

***CONTRACAECUM RUDOLPHII* (NEMATODA: ANISAKIDAE) IN
PHALACROCORAX CARBO SINENSIS (AVES: PHALACROCORACIDAE)
DEGLI STAGNI DELL'ORISTANESE (SARDEGNA, MEDITERRANEO
OCCIDENTALE)**

INTRODUZIONE

Sistematica, biologia ed epidemiologia di *Contracaecum* sp.

La superfamiglia Ascaridoidea (ordine Ascaridida) comprende cinque famiglie. Tra queste, quella Anisakidae raggruppa parassiti del tratto alimentare di vertebrati acquatici. Alla famiglia Anisakidae appartengono diverse sottofamiglie, tra cui quella *Contracaecinae*, che include tre generi: *Contracaecum*, *Phocascaris* e *Galeiceps*.

Il genere *Contracaecum* Railliet e Henry (1912) comprende più di 50 specie, parassite di pinnipedi e uccelli ittiofagi. In passato numerosi autori suggerirono che il genere andasse rivisto o modificato. Mozgovi nel 1951 propose la suddivisione del genere in tre sottogeneri: *Contracaecum* (*Erschovicaecum*), *Contracaecum* (*Contracaecum*) e *Contracaecum* (*Ornitocaecum*). Nel 1964 Berland suggerì che le specie di *Contracaecum* parassite delle foche dovessero essere comprese nel genere *Phocascaris* Host, 1932, teoria basata fondamentalmente sull'affinità dei cicli biologici. Tuttavia, le proposte di Berland non furono prese in considerazione, e Hartwich (1975) descrisse il genere sulla base delle caratteristiche morfologiche. In particolare vennero considerate la presenza di un interlabia e la posizione del poro escretore alla base dell'interlabia ventrale, caratteri che permettono di distinguerlo dal genere *Phocascaris*, nel quale gli interlabia sono assenti o di ridottissime dimensioni.

Questa classificazione destava comunque numerose incertezze, e Orecchia et al. (1986) e Nascetti et al. (1990) studiarono gli allozimi (22 loci enzimatici) dei *Contracaecum* parassiti di foche ed uccelli ittiofagi, dimostrando che le specie del complesso *Contracaecum osculatum* (Rudolphi, 1802), parassite di foche sono geneticamente più affini a quelle del genere *Phocascaris* anch'esse parassite di foche, quali *Phocascaris phocae* Host, 1932, *Phocascaris cystophorae* Berland, 1963, piuttosto che a specie congeneri parassite di uccelli ittiofagi, dimostrando alti livelli di differenziazione (Mattiucci e Nascetti, 2008).

Ulteriori studi basati sui marcatori allozimici (Nascetti et al., 1990) dimostrarono che le specie *P. phocae* e *P. cystophorae* formano un unico clade con le specie di *Contracaecum* parassite di foche (Mattiucci e Nascetti, 2008). Nel 2000 Nadler et al., attraverso studi sul rDNA nucleare (LSU rDNA) di diversi taxa di *Contracaecum* e *Phocasaris*, dimostrarono la validità di questa teoria. L'analisi dell'ITS-rDNA (Nadler et al., 2000) e della citocromossidasi 2 (mtDNA *cox-2*) (Mattiucci et al., 2008a) supportarono ulteriormente questa ipotesi. Tutte le analisi filogenetiche hanno quindi confermato l'intuizione di Berland (1964), secondo cui le specie parassite di pinnipedi dei generi *Contracaecum* e *Phocasaris* appartenessero in realtà ad un unico genere.

Gli approcci genetico-molecolari hanno inoltre permesso di individuare nell'ambito delle morfospécie del genere *Contracaecum* pools genici distinti e riproduttivamente isolati, le cosiddette "sibling species" (specie gemelle). Specie gemelle sono state definite per *C. osculatum* parassita di pinnipedi, soprattutto focidi (Deljamure, 1955; Fagerholm e Gibson, 1987), sia della Regione Boreale Artica (*C. osculatum* A, B e C) che della Regione Antartica (*C. osculatum* D ed E) (Nascetti et al., 1993; Orecchia et al., 1994; Bullini et al., 1997; Mattiucci et al., 1998). Nell'ambito della morfospécie *C. ogmorhini* Johnston e Mawson, 1941, parassita di otaridi dell'emisfero australe e boreale, sono state individuate specie gemelle indicate come *C. ogmorhini sensu stricto* e *C. margolisi* (Mattiucci et al., 2003). I marker allozimici hanno dimostrato la presenza di 6 sibling species anche all'interno della specie *C. rudolphii* Hartwich, 1964, parassita di uccelli ittiofagi, denominate *C. rudolphii* A, B, C, D, E, F (Bullini et al., 1986; D'Amelio et al., 1990, 2007, 2012; Nascetti et al., 1990; Mattiucci et al., 2002b).

Nella presente indagine saranno esaminati nematodi del genere *Contracaecum* repertati negli stomaci di cormorani *Phalacrocorax carbo sinensis* (Blumenbach, 1798) degli stagni dell'oristanese (Sardegna occidentale). Vengono di seguito descritte brevemente le caratteristiche bio-ecologiche delle specie di *Contracaecum* parassite dei cormorani.

Secondo Barus (1978), gli uccelli ittiofagi che vivono negli specchi d'acqua dolce, marina o salmastra, sono ospiti definitivi di almeno 15 specie appartenenti al genere *Contracaecum*. Tra queste, quelle parassite dei cormorani presenti in Europa sono: *Contracaecum rudolphii* (*sensu lato*) Hartwich, 1964, *Contracaecum microcephalum* (Rudolphi, 1809), *Contracaecum micropapillatum* (Stossich, 1890), e *Contracaecum septentrionale* Kreis, 1955.

Ciclo biologico di *Contracaecum* sp. (Figura 3.1)

Il ciclo biologico dei nematodi del genere *Contracaecum* è particolarmente complesso e ad oggi non ancora completamente conosciuto (Figura 3.1). Come per tutti i nematodi il ciclo si realizza attraverso 4 mute e 4 stadi larvali: L₁ - L₄, più uno adulto (Euzebby, 1961).

Gli ospiti definitivi di *Contracaecum* sp., sono pinnipedi ed uccelli ittiofagi, che vivono in ambiente marino, o acque dolci e salmastre (foche, cormorani, pellicani). Gli adulti si localizzano a livello dello stomaco e si alimentano di cibo ingerito dall'ospite; quando questo non si alimenta il parassita aggredisce e si attacca alla mucosa gastrica dell'ospite. Dopo l'accoppiamento le femmine depongono nello stomaco dell'ospite definitivo uova ovalari, a parete sottile e non embrionate che vengono eliminate nell'ambiente esterno con le feci.

Nell'acqua, all'interno dell'uovo si sviluppa la larva di primo stadio (L₁). Dopo 5-7 giorni si realizza la fase di sviluppo successiva e si libera una larva di secondo stadio (L₂) guainata. Le L₂ sopravvivono in acqua per alcune settimane (8-23 giorni) fino ad essere ingerite da un ospite invertebrato, rappresentato da crostacei (per lo più copepodi), nel cui intestino si liberano dalla guaina. Dopo aver attraversato la parete intestinale si localizzano a livello dell'emocele, dove si accrescono più o meno rapidamente in relazione alla specie ospite. Il ruolo degli ospiti invertebrati nella trasmissione di *Contracaecum* sp. non è completamente chiaro: secondo alcuni autori essi fungono da ospiti paratenici, che assicurano il passaggio delle larve di secondo stadio direttamente all'ospite successivo, che

fungo da ospite intermedio o ad altri invertebrati paratenici, che verranno a loro volta predati dall'ospite intermedio.

I pesci che si alimentano di copepodi e altri invertebrati sembrano fungere da ospiti intermedi, nei quali le larve maturano al terzo stadio (L₃). La larva può essere trasmessa ad altri pesci in seguito alla predazione dell'ospite intermedio, che svolgono il ruolo di ospiti paratenici, contribuendo alla diffusione del parassita. Gli ospiti definitivi si infestano in seguito all'ingestione dei pesci ospiti intermedi (o paratenici), ed in essi si realizzano le due mute successive e lo sviluppo allo stadio adulto del parassita, che raggiunta la maturità sessuale ricomincia il ciclo (Anderson, 2000).

Quanto sopra esposto è uno schema generico del ciclo del parassita, anche se diversi autori, per le varie specie di *Contracaecum*, hanno formulato differenti ipotesi.

Una delle specie maggiormente studiate tra i *Contracaecum* parassiti di uccelli ittiofagi è *C. rudolphii*, e ad oggi il suo ciclo non è ancora completamente conosciuto.

Olsen nel 1962 descrisse il ciclo di questa specie, denominata *C. spiculigerum*, inserendo i copepodi come ospiti intermedi. Thomas (1973) studiò il ciclo di *C. spiculigerum* negli uccelli ittiofagi degli Stati Uniti. Secondo questo autore il ciclo del parassita prevedeva semplicemente l'intervento di un solo pesce (guppy, *Poecilia reticulata*) come ospite intermedio. Nel 1966 Huizinga descrisse un ciclo più complesso, riconoscendo l'intervento sia degli invertebrati marini o d'acqua dolce, che dei pesci. Secondo quest'autore i pesci si possono infestare in seguito all'ingestione dell'ospite paratenico invertebrato o direttamente per predazione delle larve libere nell'ambiente acquatico. Mosgovoy et al. (1968a) studiarono il ciclo di *C. rudolphii* concludendo che i copepodi sono ospiti paratenici, e inserirono nel ciclo le larve delle libellule appartenenti al genere *Coenagrion*, che insieme ai pesci sarebbero ospiti intermedi. Secondo Barlet (1996) fungerebbero da ospiti intermedi solo copepodi e anfipodi, mentre i pesci sarebbero ospiti paratenici. Dziekonska-

Rynko e Rokicki (2007) conclusero che il ciclo di *C. rudolphii* coinvolge due o tre ospiti, con i copepodi ospiti paratenici, e non fondamentali per lo sviluppo del parassita. I pesci si comporterebbero da ospiti intermedi, nei quali avviene la terza muta, che però può anche avvenire nell'apparato digerente dell'ospite definitivo. Nei pesci avverrebbe comunque un rapido sviluppo e accrescimento della larva ingerita.

Secondo Moravec (2009) il ciclo di *C. rudolphii* sarebbe diretto, senza alcun ospite intermedio. Le prime due mute avvengono in ambiente acquatico, e gli invertebrati acquatici (soprattutto copepodi, ma anche altri crostacei e insetti) e i pesci, che ospitano le larve di terzo stadio, fungono solo da ospiti paratenici, anche se sembra che il passaggio attraverso questi ospiti sia obbligato per l'ecologia del parassita. Le ultime due mute avvengono nell'ospite definitivo, il quale si infesta prevalentemente in seguito all'ingestione di pesci.

Tra le altre specie di *Contracaecum* che infestano gli uccelli ittiofagi anche *C. microcephalum* ha un ciclo in parte sconosciuto. Mozgovoy et al. (1968b) riconoscono come primo ospite intermedio copepodi del genere *Cyclops*, che costituiscono una risorsa trofica per larve di libellule, chironomidi e avannotti, che fungono da secondo ospite intermedio.

Contracaecum micropapillatum ha come ospite intermedio diverse specie di copepodi e avannotti e un ospite paratenico (larve di libellule, girini e alcune specie di pesci) nei quali le larve si accrescono e si incapsulano senza compiere mute (Barus, 1978).

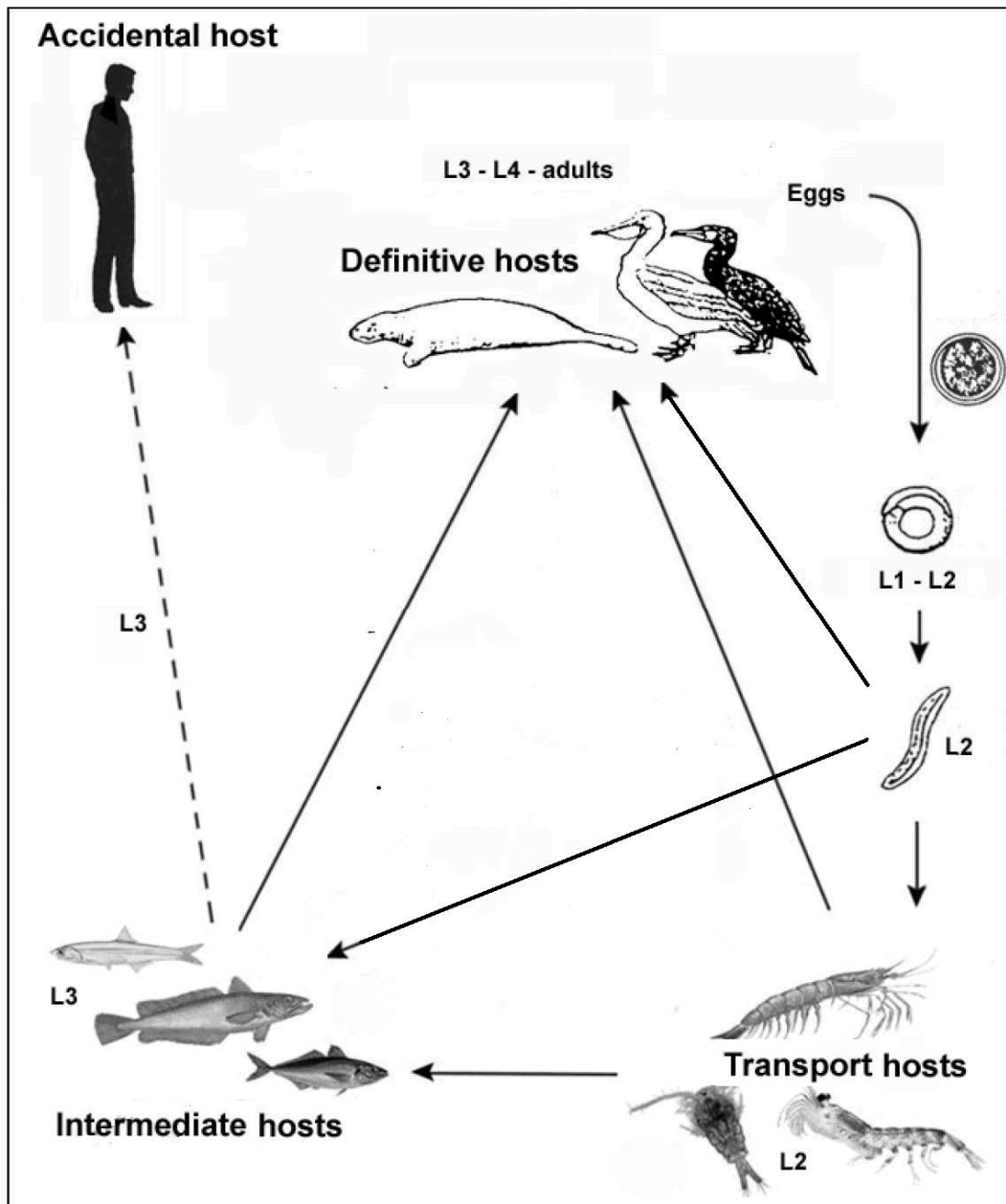


Figura 3.1. Ciclo biologico di *Contracaecum* sp. (Da EFSA, 2010, Modificato).

Anisakidosi

Col termine di anisakidosi si indica una sindrome causata dagli stadi larvali di nematodi di tre generi appartenenti alla famiglia Anisakidae: *Anisakis*, *Pseudoterranova* e *Contracaecum* (Dorny et al., 2009). L'uomo si infesta accidentalmente in seguito all'ingestione di pesce crudo, poco cotto o sottoposto a trattamenti non in grado di devitalizzare le larve (affumicatura a freddo, marinatura, salagione leggera).

I due generi più comunemente associati all'anisakidosi sono *Anisakis* e *Pseudoterranova* (Chai et al., 2005), mentre *Contracaecum* è stato segnalato solo sporadicamente come responsabile di patologia nell'uomo.

Un caso è stato segnalato in Germania, in cui il nematode è stato repertato al centro di un granuloma eosinofilo a livello intestinale (Schaum e Müller, 1967). Ishikura (2003) riporta casi di infestazione umana in Giappone e Corea, e nel 2011 Shamsi e Butcher descrivono il primo caso di anisakidosi umana in Australia, il cui agente eziologico è stato identificato come una larva del genere *Contracaecum*.

La patogenesi e la sintomatologia dell'anisakidosi da *Contracaecum* sono in linea di massima sovrapponibili a quanto già detto per l'anisakiasi (Cap. 2). Le infestazioni nell'uomo da parte di larve del genere *Contracaecum* sono spesso asintomatiche, e vengono diagnosticate solo in seguito all'identificazione del parassita spesso eliminato con il vomito o con le feci (McKarty e Moore, 2000; Shamsi e Butcher, 2011). Il parassita può anche essere responsabile di una sindrome gastrointestinale, caratterizzata da nausea, vomito, diarrea, dolore addominale ed eventualmente anche febbre, brividi e sudorazione (Shamsi e Butcher, 2011).

Cenni di sistematica e biologia del cormorano *Phalacrocorax carbo sinensis* (Blumenbach, 1798)

Phalacrocorax carbo sinensis (Blumenbach, 1798) appartiene all'ordine Pelecaniformes, famiglia Phalacrocoracidae. Il genere *Phalacrocorax* comprende oltre 30 specie e 5 sottospecie, distribuite in tutti i continenti, fatta eccezione del Sud America e dell'Antartide. La specie più importante presente in Italia è *Phalacrocorax carbo*, a cui sono riconducibili due sottospecie: *Phalacrocorax carbo carbo* (Linnaeus, 1758) e *Phalacrocorax carbo sinensis* (Blumenbach, 1798).

Il primo ha dimensioni maggiori, è presente lungo le coste dell'Atlantico settentrionale, e nidifica sulle falesie delle coste atlantiche della Norvegia, della Gran Bretagna e dell'Islanda. *Phalacrocorax carbo sinensis* è più piccolo, ed è diffuso nelle zone umide interne e costiere del centro Europa e del Mediterraneo. Nidifica in aree fluviali o lacustri, sugli alberi, ma anche a terra. In Italia è diffuso prevalentemente come svernante. I siti di nidificazione nel nostro Paese sono una decina localizzati nelle lagune dell'oristanese (Sardegna occidentale), in Piemonte ed in alcune zone umide dell'Emilia-Romagna e del Veneto (Carpegna et al., 1997; Volponi, 1999). *Phalacrocorax carbo sinensis* è una specie gregaria, migratrice, che alla fine dell'estate abbandona i paesi più freddi per svernare nell'Europa centro meridionale e nelle coste del nord Africa. Vive in ambienti acquatici marini e salmastri, ma si adatta bene anche a vivere in zone d'acqua dolce prive di abbondante vegetazione (Arru, 1994).

Questa specie è strettamente piscivora, ma in carenza di pesce si nutre di invertebrati acquatici. Pesca da solo, in piccoli gruppi o in stormi di diverse centinaia di individui, in relazione soprattutto alla gregarità delle prede ed al grado di limpidezza e trasparenza delle acque. Si nutre di pesci di specie e taglia diversa, ma la sua dieta varia da zona a zona ed è influenzata dalla località e dal periodo dell'anno. Negli stagni dell'oristanese sembra che le prede più comuni appartengano alla famiglia dei mugilidi (*Mugil* sp., *Liza* sp.), signatidi, sparidi, *Atherina* sp., *Dicentrarchus labrax*, e *Anguilla anguilla* (Cau et al., 1991; Briguglio et al., 2010).

Intorno agli anni '60 il cormorano risultava praticamente scomparso in gran parte dell'Europa, a seguito della contaminazione ambientale e delle opere di bonifica delle zone umide, con la conseguente distruzione degli habitat di nidificazione e svernamento. La specie è stata quindi riconosciuta in via d'estinzione, e da proteggere sia a livello nazionale che internazionale (Dir. CEE 409/79). In seguito alla messa in pratica di tali provvedimenti le popolazioni dei cormorani si sono sviluppate in maniera esponenziale, determinando la colonizzazione di nuovi areali ed una maggiore presenza nelle aree di svernamento (Arru, 1994; Veldcamp, 1996). La Sardegna occidentale, in particolare le zone umide della provincia di Oristano, rappresentano un importante areale di svernamento e nidificazione per *P. carbo sinensis*, e al mese di gennaio del 2009 risultavano censiti 6.741 soggetti. Questi volatili sembrano essere responsabili di ingenti perdite alle produzioni ittiche, e al fine di tutelare la produzione ittica degli stagni dell'oristanese la Regione Autonoma della Sardegna ha disposto delle campagne di abbattimento controllato.

MATERIALI E METODI

Campionamento

La presente indagine è stata svolta in seguito ad una campagna di abbattimento controllato di cormorani effettuato dal 5 al 27 febbraio 2009 nei compendi ittici costieri dell'oristanese (Figura 3.2) al fine di tutelare la produzione ittica.

Con il decreto N° 2225/3 del 30 gennaio 2009 "*Azione di protezione delle produzioni ittiche negli stagni dell'oristanese dalla predazione degli uccelli ittiofagi. Campagna di prevenzione per il mese di febbraio 2009*" l'Assessorato Regionale della Difesa dell'Ambiente aveva disposto l'abbattimento di un numero di cormorani pari ad un massimo del 4% dei 6.741 censiti nel mese di gennaio del 2009 negli stagni dell'oristanese. Il decreto stabiliva inoltre la necessità di utilizzare i capi abbattuti per effettuare uno studio sull'alimentazione dei cormorani, e quindi sul loro contenuto stomacale.

L'analisi del contenuto stomacale è stata effettuata a cura della Merops srl in collaborazione con il Dipartimento di Oristano dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna, prelevando ed esaminando le ingesta più integre, il cui grado di conservazione ne permettesse l'identificazione, ed i cui risultati sono riportati nella relazione "*Valutazione del contenuto stomacale di Cormorani (*Phalacrocorax carbo sinensis*) abbattuti nel Febbraio 2009 negli stagni della provincia di Oristano*" (Briguglio et al., 2010).

Il resto del contenuto stomacale, i parassiti, ed il lavaggio della mucosa gastrica (Figura 3.3) sono stati setacciati per recuperare tutto il materiale presente nello stomaco, che è stato riposto in contenitori contrassegnati con un numero identificativo dell'animale, e conservati a -20° C.

I residui dei contenuti stomacali così preparati sono stati inviati al Laboratorio di Ittioparassitologia del Dipartimento di Medicina Veterinaria dell'Università di Sassari per essere sottoposti ad esame parassitologico.



Figura 3.2. Gli stagni dell'oristanese, siti di provenienza dei campioni.

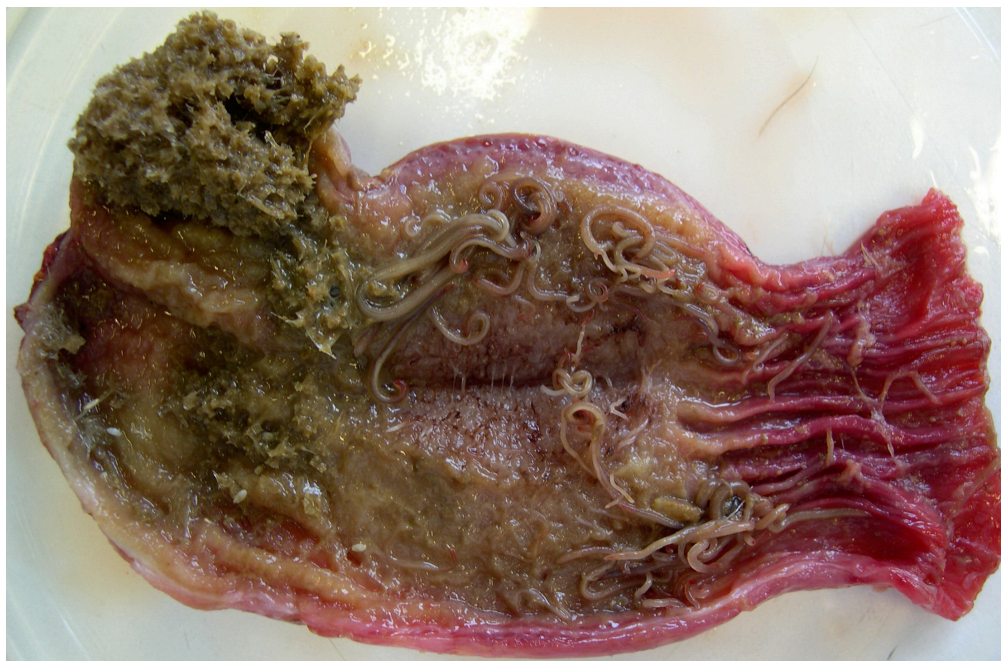


Figura 3.3. Stomaco di *Phalacrocorax carbo sinensis* con residui di contenuto stomacale ed infestazione da *Contracaecum* sp.

Indagine parassitologica

Complessivamente sono stati esaminati per la presenza di *Contracaecum* sp. i contenuti stomacali di 41 cormorani. La provenienza ed il numero di esemplari ospite esaminati sono indicati in Tabella 3.I.

Tabella 3.I. Numero campioni esaminati per ciascun sito.

PROVENIENZA	N.
Stagno di Cabras	16
Stagno di Marceddì	12
Stagno di Is Benas	3
Stagno di Mistras	1
Stagno di Santa Giusta	3
Stagno di S'Ena Arrubbia	6
Tot	41

Il materiale presente in ciascun contenitore è stato lavato e setacciato con maglia 500 μm , privato dei frammenti più grossolani di materiale digerito, e messo a sedimentare in calici con acqua di fonte. Il surnatante è stato eliminato, ed il materiale sedimentato è stato osservato allo stereomicroscopio per la ricerca degli stadi larvali ed adulti di *Contracaecum* sp.

Identificazione morfologica dei parassiti

I nematodi del genere *Contracaecum* repertati sono stati dapprima osservati in toto allo stereomicroscopio per l'esame dei caratteri macroscopici. Successivamente sono stati diafanizzati in alcol glicerinato (70% glicerina - 30% etanolo 70%), montati in preparati temporanei su vetrino portaoggetti, ed osservati al microscopio ottico. I parassiti sono stati fotografati e misurati con un sistema microfotografico, identificati, e suddivisi in larve di terzo stadio (L_3), larve di quarto stadio (L_4) e adulti maschi e femmine. I parassiti così classificati sono

stati contati e conservati in etanolo 70% per essere successivamente sottoposti ad esame morfologico e molecolare.

L'identificazione morfologica degli individui adulti è stata effettuata secondo le descrizioni di Hartwich (1974), Barus et al. (1978) e Abollo et al. (2001c). Per la descrizione di *C. septentrionale* è stato fatto riferimento a Kreis (1955). Per le larve di quarto stadio si è fatto riferimento alle descrizioni di Barlett (1996) e Kanarek e Bohdanowicz (2009).

In particolare, per gli individui adulti sono stati presi in considerazione i seguenti caratteri (Figura 3.4):

- Dimensione e forma degli interlabia
- Negli individui di sesso maschile:
- Numero e pattern delle papille pre-cloacali
 - Numero e pattern delle papille post-cloacali
 - Lunghezza e forma della estremità degli spicoli

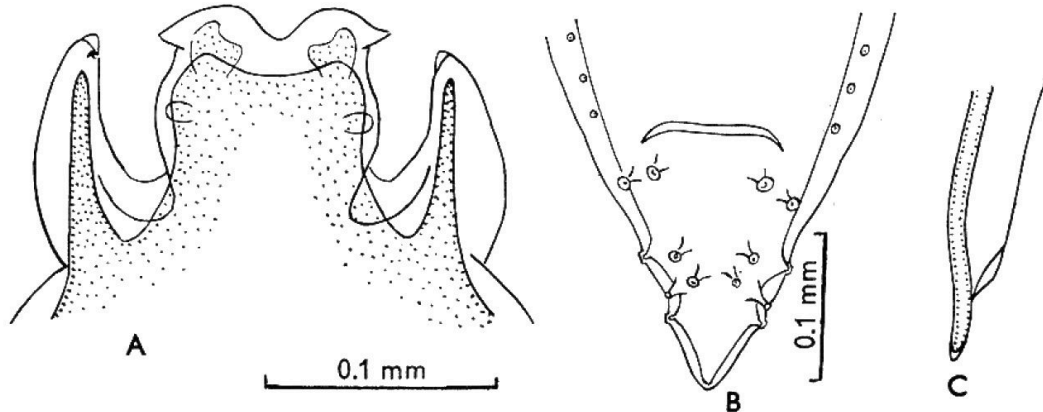


Figura 3.4. *Contracaecum rudolphii*, schema dei principali caratteri presi in considerazione per l'identificazione morfologica degli adulti. Estremità cefalica, vista dorsale (A); estremità posteriore del maschio, vista ventrale (B); estremità distale dello spicolo (C). (da Hartwich, 1964 e Barus et al., 1978).

Analisi molecolare

Prima dell'estrazione del DNA ciascun nematode è stato accuratamente lavato in acqua distillata sterile, sono state asportate le porzioni craniale e caudale per successive eventuali indagini morfometriche, che sono state conservate in etanolo 70% in microprovette debitamente contrassegnate. Per l'estrazione degli acidi nucleici è stato impiegato il kit commerciale della Promega (Wizard Genomic DNA purification Kit, Germania) seguendo le istruzioni fornite dalla casa produttrice. Il DNA estratto è stato conservato a -20° C.

PCR

Un frammento interno del gene della *cox-2* di DNA mitocondriale (mtDNA) è stato amplificato utilizzando i primers forward 211 (5'-TTT TCT AGT TAT ATA GAT TGR TTY AT-3') e reverse 210 (5'-CAC CAA CTC TTA AAA TTA TC-3') (Nadler e Hudspeth, 2000).

Tutte le PCR sono state allestite in un volume finale di 50 µl, contenenti 7 µl di DNA (5 ng/µl), 5 U Taq (Eurotaq, Heidelberg, Germania), 2,5 µl di PCR buffer 10×, 10 mM dNTP, 50 mM MgCl₂, e 10 µM di ciascun primer. Un controllo negativo ed uno positivo sono stati inclusi in tutte le reazioni di amplificazione realizzate usando un termociclatore Perkin-Elmer Gene Amp PCR System 9700.

Il regime di temperature utilizzato è stato il seguente: denaturazione iniziale di 2 min a 94° C seguiti da 35 cicli di denaturazione a 94° C per 1 min, annealing a 46° C per 1 min, 72° C per 90 sec, seguiti da una estensione finale a 72° C per 5 min.

Otto µl dei prodotti di amplificazione sono stati visualizzati e fotografati agli UV (Uvisave Sistem) dopo corsa elettroforetica in gel di agarosio al 2% in TAE 1×, per 30 min a 4 V/cm, e successiva colorazione con Bromuro di Etidio (0,24 µg/ml).

Sequenziamento

Il prodotto della PCR è stato purificato utilizzando il kit commerciale NucleoSpin Extract (Macherey-Nagel, Duren, Germania) seguendo le istruzioni della casa produttrice. Il sequenziamento è stato eseguito dalla MWG-BIOTECH AG (Ebersberg, Germania).

Le sequenze sono state aggiustate e assemblate utilizzando il software MEGA 5 (Tamura et al., 2011) e allineate con il programma ClustalW e realizzate con il software MEGA 5.

L'analisi di maximumlikelihood è stata effettuata utilizzando il programma MEGA 5. È stato impostato un modello evolutivo six-rates custom che consente di stimare le proporzioni dei siti invariabili e la distribuzione di gamma. È stato utilizzato l'algoritmo SPR (subtree pruning and regrafting) con 1.000 repliche di bootstrap.

Le relazioni genetiche tra individui sono state valutate con il programma MEGA 5 utilizzando l'algoritmo neighbourjoining (NJ), ed escludendo dall'analisi le inserzioni/delezioni (indels) di probabile scarso valore filogenetico (Redd e Stoneking, 1999). Le relazioni evoluzionistiche sono state calcolate con il modello a due parametri di Kimura, con un bootstrap di 1.000 repliche. Sia per l'albero ML che per quello NJ i nodi con percentuale di bootstrap <70% sono stati considerati non supportati statisticamente (Hills e Bull, 1993).

Analisi statistica

Per ogni esemplare di cormorano esaminato è stata valutato il numero di L₃, L₄, e adulti maschi e femmine di *Contracaecum* sp. presenti, al fine di calcolare gli indici epidemiologici di Bush et al. (1997):

- Prevalenza, numero di individui di una specie ospite infestati da una specie parassitaria ÷ numero totale degli esemplari della specie ospite esaminati.
- Intensità di infestazione, numero di individui di una specie parassitaria in ogni individuo ospite.

- Intensità media, numero totale degli individui di una determinata specie parassitaria in un campione \div numero degli individui ospiti infestati da quella specie nell'interno del campione.

Le elaborazioni statistiche sono state effettuate mediante foglio di calcolo e con il programma Quantitative Parasitology 3.0 (Reiczigel e Rózsa, 2005). In particolare, le differenze della prevalenza e dell'intensità media sono state valutate con il test esatto di Fisher ed il bootstrap test, rispettivamente.

RISULTATI

Descrizione morfologica dei parassiti

Sulla base delle indagini morfologiche, con particolare riferimento a dimensione e forma degli interlabia (per entrambi i sessi), numero e pattern delle papille pre- e post-cloacali, lunghezza e forma dell'estremità degli spicoli (maschi) tutti gli esemplari adulti sono stati identificati come *Contracaecum rudolphii* (*sensu lato*). Le larve di quarto stadio sono state tutte identificate come *Contracaecum* sp. Non sono state repertate larve di terzo stadio.

Di seguito viene riportata una breve descrizione dei parassiti esaminati; le medie delle misurazioni sono seguite dal range di variazione.

Larve di quarto stadio (Figura 3.5)

Le larve di quarto stadio, di colore bianco-giallastro, sono lunghe 7,55 mm (5-10 mm) e larghe 0,22 mm (0,15-0,26 mm) (Figura 3.5 A). La superficie della cuticola è liscia, eccetto nella porzione anteriore, che è striata trasversalmente. L'apertura buccale è sormontata da tre labbra, una dorsale e due ventro-laterali, poco sviluppate (Figura 3.5 B). Non sono presenti interlabia. Il ventricolo è piccolo ed ovale, il cieco intestinale è leggermente più lungo (90 μ m, 43-100 μ m) dell'appendice ventricolare (60 μ m, 36-82 μ m). I primordi genitali sono ovali e visibili. La coda è conica e priva di papille (Figura 3.5 C).



Figura 3.5. *Contracaecum* sp., larva di quarto stadio. Individuo in toto(A), particolare dell'apertura buccale (B), estremità caudale (C).

Adulti (Figure 3.6-9)

Il corpo è robusto (Figura 3.6) e rivestito in tutta la sua lunghezza (eccetto le labbra) da una cuticola striata trasversalmente. Le tre labbra, due ventro-laterali ed una dorsale, sono prominenti (Figura 3.7 A), prive di creste, leggermente più larghe (116 μm , 111-126 μm) che lunghe (99 μm , 92-120 μm). La polpa labiale forma due lobi, ognuno diviso in altri due, uno laterale ed uno mediano, entrambi arrotondati.

Gli interlabia (Figura 3.7 B), lunghi circa quattro quinti della lunghezza delle labbra, misurano 84 μm (68-106 μm) e hanno estremità distintamente biforcata. Il ventricolo è corto, incospicuo, con appendice postero-ventrale lunga 0,9 mm (0,5-1,3 mm). Il cieco intestinale è lungo 2,5 mm (1,5-3,5 mm).



Figura 3.6. *Contracaecum rudolphii*, adulti. In alto la femmina e in basso il maschio.

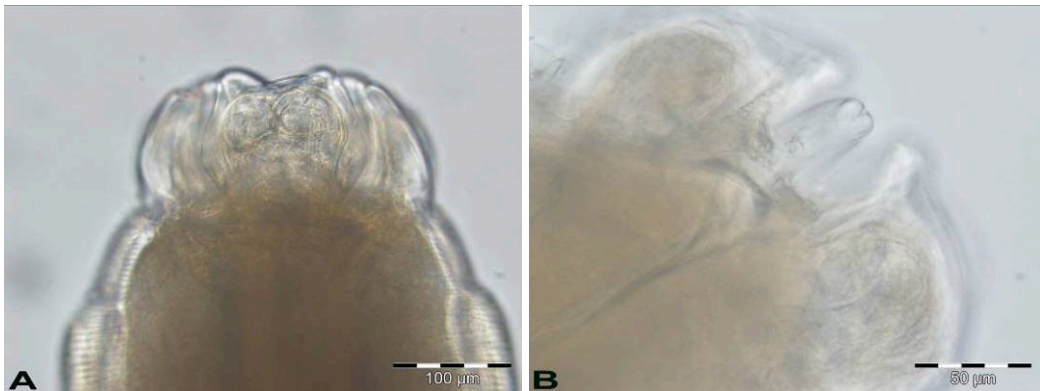


Figura 3.7. *Contracaecum rudolphii*, adulto. Particolare delle labbra (A) e dell'interlabia (B).

I maschi, più piccoli delle femmine (Figura 3.6), sono lunghi 23 mm (18,5-30 mm) e larghi 0,45 mm (0,30-0,60 mm). Hanno spicoli lunghi 7,30 mm (5,95-8,20 mm) eguali o subeguali, alati e con estremità distale arrotondata (Figura 3.8 B). Le due ali si sovrappongono distalmente e terminano a 25 μ m (19-28 μ m) dall'apice dello spicolo. L'estremità caudale è conica (Figura 3.8 A), con punta curva. Presenta 27-43 paia di papille pre-cloacali (Figura 3.8 C), distribuite in maniera irregolare su due file longitudinali, e 7 paia di papille post-cloacali semplici (Figura 3.8 A). Di queste ultime, due paia sono situate immediatamente a ridosso della cloaca, mentre le restanti cinque nella terza metà distale della coda, tre paia lateralmente, e due medialmente.

Le femmine (Figura 3.6) sono lunghe 34 mm (28-53 mm) e larghe 0,87 mm (0,50-1,25 mm). La vulva si trova a livello di giunzione tra primo e secondo quarto della lunghezza corpo. Presentano coda conica (Figura 3.9), con un paio di fasmidi papillati, localizzati sub-lateralmente.

Sulla base delle descrizioni di Hartwich (1974), Barus et al. (1978), Abollo et al. (2001) e Kreis (1955) i caratteri che hanno permesso di identificare gli esemplari come appartenenti al complesso *C. rudolphii* sono stati soprattutto il numero delle papille post-cloacali (sette paia). Questo carattere è presente anche in *C. microcephalum*, ma quest'ultima specie differisce da *C. rudolphii* per la conformazione distintamente arrotondata e non biforcata dell'estremità terminale dell'interlabia.

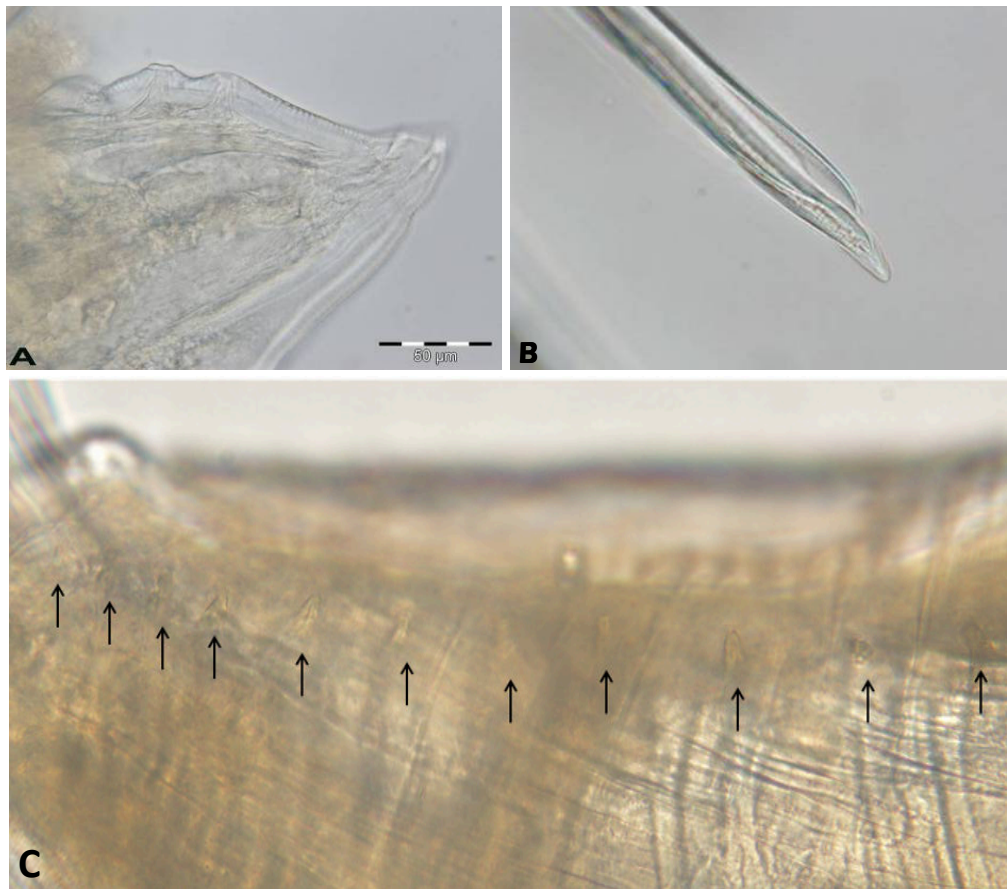


Figura 3.8. *Contracaecum rudolphii*, adulto maschio. Papille post-cloacali (A); estremità distale dello spiculo (B); papille pre-cloacali (C, frecce).



Figura 3.9. *Contracaecum rudolphii*, adulto femmina. Particolare dell'estremità caudale.

Analisi molecolare

PCR

Trenta adulti morfologicamente identificati come *Contracaecum rudolphii* (*sensu lato*) e tre larve di quarto stadio identificate come *Contracaecum* sp. sono stati analizzati mediante PCR. L'amplificazione del frammento interno del gene della *cox-2* del DNA mitocondriale (mDNA) con i primers forward 211 e reverse 210 ha prodotto un frammento di circa 630 bp (Figura 3.10).

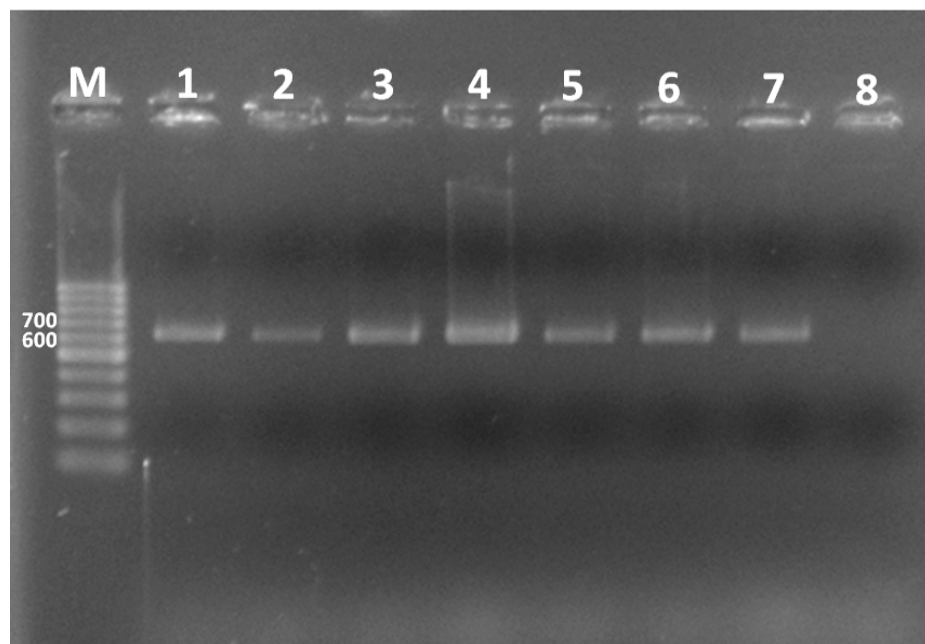


Figura 3.10. Corsa elettroforetica della PCR del frammento della *cox-2*. M, marker; 1, controllo positivo; 8, controllo negativo.

Sequenziamento

Il mDNA del frammento della *cox-2* amplificato da 26 campioni è stato sequenziato, e le sequenze analizzate per individuare la specie di appartenenza.

Nell'analisi delle sequenze sono state inserite le sequenze delle due specie appartenenti al complesso *C. rudolphii* repertate in cormorani dell'Europa (*C. rudolphii* A GB# EF558891 e B GB# EF513506), le sequenze delle altre specie di *Contracaecum* potenziali parassite di *P. carbo sinensis*: *C. septentrionale* (GB#

EF513513), *C. microcephalum* (GB# EF122208) *C. micropapillatum* (GB# EU852350), e la sequenza di una specie parassita dei pinnipedi, *C. osculatum* (GB# 122211). *Anisakis pegreffii* (GB# EU413958) è stato utilizzato come outgroup.

L'analisi di maximumlikelihood (ML) ha raggruppato gli individui esaminati in due cluster (Figura 3.11) supportati da alti valori di bootstrap. Il cluster A è costituito dalla specie *C. rudolphii* A GB# EF558891, da 6 individui adulti maschi e 14 femmine morfologicamente identificati come *C. rudolphii (sensu lato)*, e da 3 larve di quarto stadio, identificate morfologicamente come *Contracaecum* sp. Il cluster B è costituito da *C. rudolphii* B GB# EF513506, e da 3 individui adulti (1 maschio e 2 femmine) morfologicamente identificati come *C. rudolphii (sensu lato)*. La radice dell'albero è rappresentata dall'outgroup *Anisakis pegreffii*.

L'analisi di neighbourjoining è coerente con quella di maximumlikelihood (ML), e mostra sia la stessa topologia dell'albero che gli stessi nodi altamente supportati (per valori di bootstrap, vedere la Figura 3.11).

I tre individui identificati come *C. rudolphii* B sono stati repertati in tre differenti ospiti, infestati anche da *C. rudolphii* A.

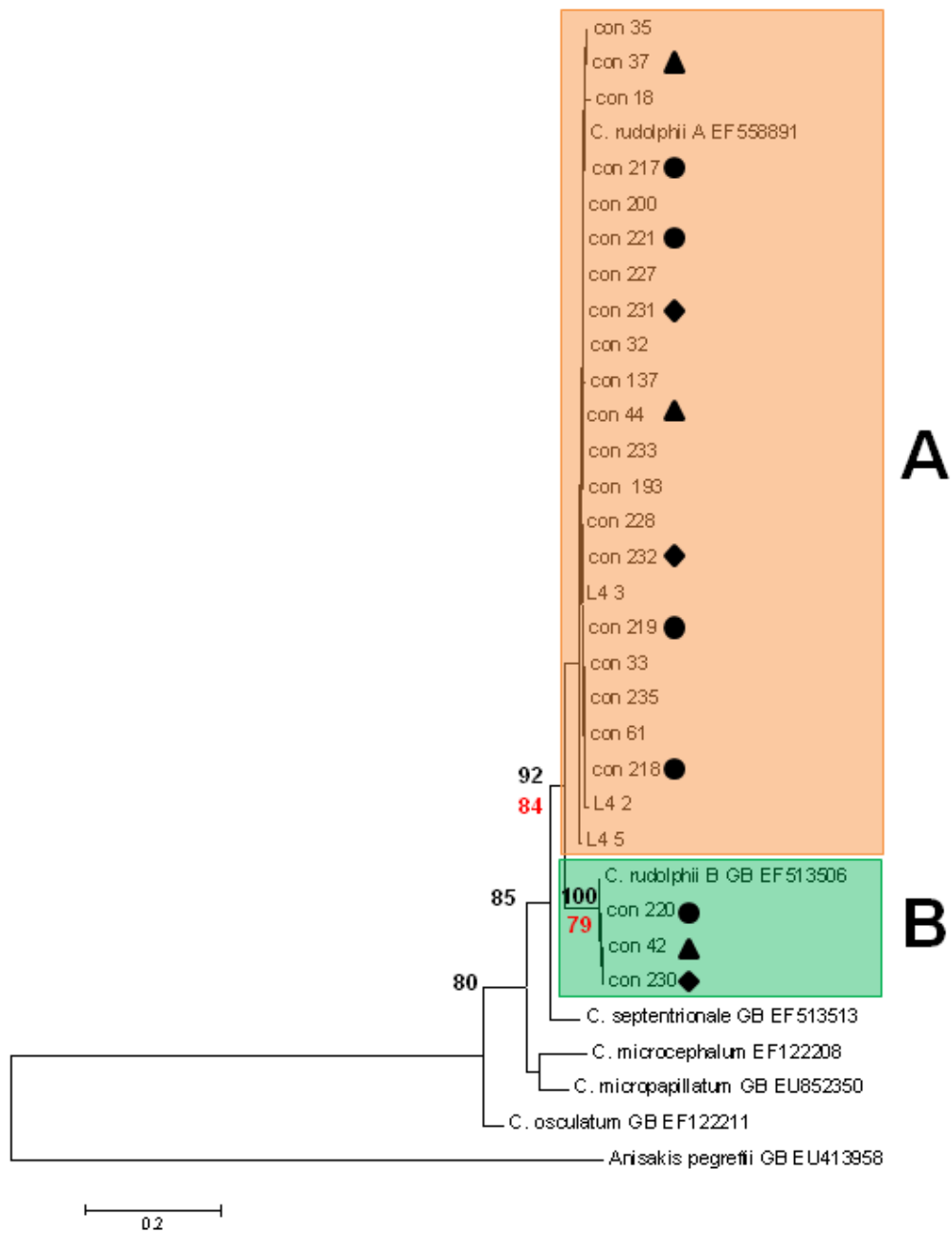


Figura 3.11. Albero ML. La scala rappresenta il numero di sostituzioni per sito. Il supporto dei cluster principali (espresso come valore di bootstrap) è indicato in nero. I valori di bootstrap ottenuti per l'analisi NJ sono in rosso. con: prefisso per individui adulti; L4: prefisso per indicare larve di quarto stadio. ●, ◆, ▲, ospiti che presentavano coinfezione.

Analisi statistica

I risultati quantitativi, schematizzati nella tabella 3.II, evidenziano che tutti i cormorani esaminati sono risultati infestati da *Contracaecum rudolphii* (P=100%), con un'intensità di infestazione media totale di 279, e con range di variazione da 15 sino a 1.075 (Tabella 3.II). La prevalenza di *Contracaecum rudolphii* maschi e femmine è risultata pari al 100%, e dell'83% quella delle L₄. L'intensità di infestazione media totale di L₄, adulti maschi e adulti femmine è risultata rispettivamente di 17,1, 107,3 e 155.

Stratificando i risultati per sesso, peso netto (peso vivo - peso contenuto stomacale) e provenienza dell'ospite (Tabella 3.II), sono state rilevate differenze significative solo tra l'intensità di infestazione media (sia totale, che di L₄, adulti maschi e femmine) della classe di peso più alta (3,0-3,4 kg) rispetto alle altre tre classi di peso, mentre tra sessi e località non sono state evidenziate differenze significative.

Nella Figura 3.12 sono rappresentati graficamente i risultati stratificati per peso, evidenziando la notevole differenza tra l'intensità di infestazione nella classe di peso degli ospiti più grandi, rispetto alle altre.

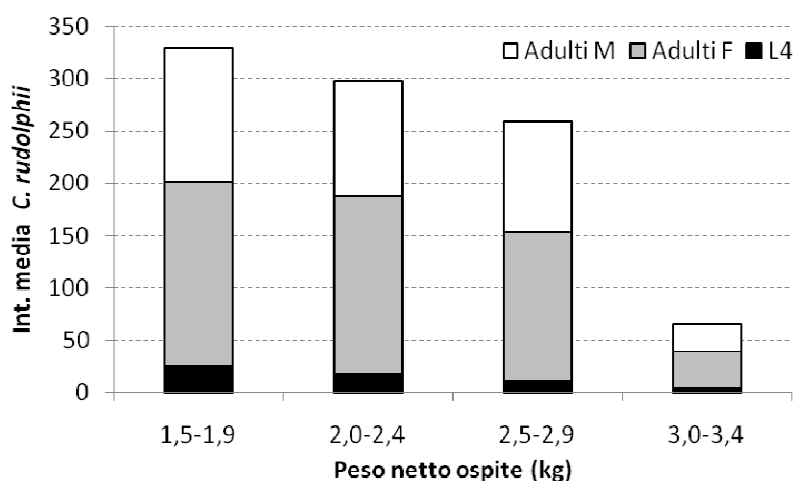


Figura 3.12. Intensità media di *Contracaecum rudolphii* in *Phalacrocorax carbo sinensis*, in relazione al peso netto dell'ospite (peso vivo – peso contenuto stomacale).

Tabella 3.II. Livelli di infestazione di *Contraecaecum rudolphii* in *Phalacrocorax carbo sinensis* degli stagni dell'Oristanese. Risultati totali e stratificati per sesso dell'ospite, peso netto dell'ospite (peso vivo – peso contenuto stomacale), e località d'origine. Tra parentesi range d'intensità.

	P%	Int media	Intensità media		
		L4	Adulti F	Adulti M	Tot
Tot	83%	17,1 (1-162)	107,3 (40-340)	155,0 (11-680)	279,4 (15-1.075)
Sesso ospite					
M	82%	16,0 (1-61)	181,4 (11-680)	122,5 (4-340)	319,9 (15-1.075)
F	83%	18,0 (1-162)	136,4 (33-407)	96,5 (16-292)	250,8 (62-703)
P. netto (kg)					
1,5-1,9	89%	25,4 (4-162)	175,7 (38-407)	128,4 (16-292)	329,6 (62-703)
2,0-2,4	85%	18,3 (11-77)	169,2 (11-680)	110,8 (4-340)	298,3 (15-1.075)
2,5-2,9	71%	10,9 (2-50)	142,8 (56-300)	105,2 (27-221)	258,9 (83-571)
3,0-3,4	80%	3,3 (1-9)	35,7 (22-43)	26,3 (16-32)	65,3 (38-84)
Origine					
Cabras	69%	19,0 (1-162)	190,3 (11-680)	125,6 (4-380)	334,9(15-1.075)
Marceddì	100%	16,4 (1-61)	145,5 (33-489)	105,3 (32-321)	267,2 (73-871)
Is benas	100%	32,7 (2-77)	100,3 (42-134)	63,3 (27-84)	196,3 (146-232)
Mistras	-	50,0 (-)	300,0 (-)	221,0 (-)	571,0 (-)
Santa Giusta	67%	4,0 (3-9)	96,3 (35-142)	84,0 (40-120)	184,3 (75-271)
S'Ena arrubia	83%	7,0 (6-12)	112,5 (22-306)	77,2 (15-178)	196,7 (38-484)

DISCUSSIONE

I risultati della presente indagine rappresentano un contributo alla conoscenza della diffusione ed all'identificazione morfologica e molecolare dei nematodi del genere *Contracaecum* che infestano i cormorani degli stagni dell'oristanese (Sardegna, Mediterraneo occidentale).

Le indagini morfologiche hanno permesso di identificare tutte le larve di quarto stadio appartenenti al genere *Contracaecum*, e gli adulti, maschi e femmine, come *C. rudolphii* (*sensu lato*). In seguito all'analisi delle sequenze del frammento della *cox-2*, 23 campioni sono stati identificati come *C. rudolphii* A e 3 come *C. rudolphii* B. In particolare, i tre individui della seconda specie sono stati repertati in tre differenti ospiti, infestati anche da *C. rudolphii* A.

Contracaecum rudolphii A e *C. rudolphii* B sono i due principali nematodi parassiti della sottospecie di *P. carbo sinensis* in Europa, rispettivamente negli ambienti di acque salmastre e dolci, (Mattiucci et al., 2002). *Contracaecum rudolphii* A è stato identificato in cormorani delle coste atlantiche della Spagna (Abollo et al., 2001; Li et al., 2005), nonché nel marangone dal ciuffo *Phalacrocorax aristotelis* proveniente da ambienti marini del Nord Sardegna (Farjallah et al., 2008c). La specie gemella *C. rudolphii* B è stata identificata in cormorani di ambienti d'acqua dolce del centro Europa (Mattiucci et al., 2008b). Le due specie sono anche state repertate coesistenti in *P. carbo sinensis* nelle lagune di Venezia e Carole (Mattiucci et al., 2002b), e nella regione Baltica (Szostakowska e Fagerholm, 2012) e secondo questi autori la coesistenza delle due specie sarebbe più frequente di quanto riportato in letteratura.

I dati relativi all'identificazione molecolare di larve di *Contracaecum* sp. nei pesci in Italia ed in Europa sono scarsi. Larve di *C. rudolphii* A sono state identificate in *Anguilla anguilla* e *Dicentrarchus labrax* provenienti da lagune dell'Italia settentrionale (Mattiucci et al., 2002b), ed anche in *A. anguilla* e *D. labrax* pescate in lagune del Sud della Sardegna (Culurgioni et al., 2013). Invece, larve di *C. rudolphii* B sono state descritte in pesci d'acqua dolce come il rutilo

Rutilus rutilus dei laghi del centro Europa (lago Mazury, Polonia) (Mattiucci et al., 2008b). Studi molecolari su larve di terzo stadio di *C. rudolphii* in pesci della Polonia (Szostakowska e Fagerholm, 2007) hanno permesso di identificare entrambe le specie (*C. rudolphii* A e *C. rudolphii* B) nel ghiozzo *Neogobius melanostomus* di acque salmastre, mentre *C. rudolphii* B è stato repertato solo nel carassio *Carassius carassius* in acque dolci.

In base ai dati bibliografici ed ai risultati del presente lavoro, *C. rudolphii* A sembra avere un ciclo prevalentemente legato all'ambiente marino e salmastro (Mattiucci et al., 2002b), mentre quello di *C. rudolphii* B sembra legato all'ambiente dulciacquicolo (Mattiucci et al., 2008b).

L'identificazione di tutte le larve di quarto stadio come *C. rudolphii* A suggerisce che queste siano state acquisite dall'ospite negli stagni dell'oristanese. Tale ipotesi è confermata inoltre dall'analisi del contenuto stomacale dei cormorani (Briguglio et al., 2010), composto da specie ittiche tipiche di ambienti lagunari e costieri. D'altro canto, l'identificazione dei parassiti adulti come *C. rudolphii* B fa ipotizzare che questa specie abbia infestato gli ospiti in ambienti diversi da quelli delle lagune oggetto dell'indagine. *Phalacrocorax carbo sinensis* è infatti una specie migratoria, diffusa nelle zone umide interne e costiere del centro Europa e del Mediterraneo, e che in Sardegna è presente prevalentemente come svernante. Quindi, con buona probabilità *C. rudolphii* B potrebbe avere infestato l'ospite negli ambienti dulciacquicoli del centro Europa, dove larve di terzo stadio di questa specie sono state identificate nei pesci (Szostakowska e Fagerholm, 2007; Mattiucci et al., 2008).

Considerate le modalità di trasmissione dei parassiti delle diverse specie del genere *Contraecaecum*, oltre che le loro caratteristiche ecologiche e la loro specifica distribuzione geografica, questi nematodi possono essere utilizzati come marche biologiche (biological tags), con particolare riguardo allo stato delle reti trofiche di ecosistemi marini, salmastri e dulciacquicoli, come già osservato per altre specie di nematodi anisakidi (Mattiucci et al., 1997, Mattiucci e Nascetti 2007). Inoltre, la loro presenza potrebbe essere utilizzata anche per seguire e

monitorare le rotte migratorie dei cormorani, ed approfondire le conoscenze sulle loro abitudini ed adattamenti alimentari.

Dal punto di vista epidemiologico, tutti i cormorani esaminati nel presente lavoro sono risultati infestati da larve ed adulti di *C. rudolphii*, confermando le elevate prevalenze riportate in letteratura (Garippa et al., 1996; Kanarek et al., 2011; Dakhly et al., 2012). Da rilevare la differenza significativa tra intensità d'infestazione della classe di peso più alta (3,0-3,4 kg) rispetto alle altre tre. L'intensità media dei parassiti cala infatti bruscamente, passando da 258-329 nelle prime tre classi di peso, a 65 in quella degli individui più grandi. Nonostante nella presente indagine le differenze rilevate siano significative, la classe con peso più alto è costituita da tre soli individui, quindi il risultato deve essere interpretato con cautela. Dati simili sono stati riportati anche da altri autori; Kanarek et al. (2011) suggeriscono che tale aspetto potrebbe essere dovuto alla maggiore suscettibilità di alcuni individui tra i giovani, determinandone l'eliminazione e la sopravvivenza degli adulti più resistenti. Secondo Dakhly et al. (2012) il fenomeno potrebbe essere associato all'abitudine dei cormorani a rigurgitare parte dell'alimento ingerito, così come riportato da Malacalza et al. (1994), in una sorta di "meccanismo di depurazione".

Gli elevati livelli di infestazione negli ospiti definitivi suggeriscono una rilevante presenza di L₃ di *C. rudolphii* A nelle specie ittiche degli ambienti lagunari e costieri dell'oristanese. Considerato che i cormorani acquisiscono *C. rudolphii* A negli stessi ambienti in cui sono avvenuti cattura e abbattimento, e che il contenuto stomacale degli ospiti esaminati risulta composto principalmente da mugilidi, signatidi, sparidi, *Atherina* sp., *Dicentrarchus labrax* e *Anguilla anguilla* (Briguglio et al., 2010), è ipotizzabile che tali specie ittiche siano responsabili della trasmissione delle larve di terzo stadio ai cormorani. Tale ipotesi sembra confermata dai pochi studi sulla presenza di questi parassiti in pesci provenienti dagli stagni della Sardegna. Infatti Merella e Garippa (2001) riportano larve di *Contracaecum* sp. con una prevalenza del 9% in *L. aurata* pescata nello stagno di Mistras, Salati et al. (2013) riportano una prevalenza del

14% in *L. ramada*, e prevalenze del 100% e del 36% in *S. aurata* e *D. labrax* pescati negli stagni dell'oristanese, e Culurgioni et al. (2010a,b) prevalenze del 25% in *A. anguilla* e in del 92% in *D. labrax*.

Al contrario che per *Anisakis* sp., nel nostro paese non sono stati riportati casi di anisakidosi umana dovuti a *Contracaecum* sp. Ciò può essere attribuito alle abitudini alimentari locali, che in linea di massima non prevedono preparazioni a crudo con le specie ittiche lagunari probabili ospiti del parassita, anche se per alcune di quelle pregiate, quali spigola ed orata, è sempre più comune la preparazione di carpacci. Deve anche essere considerato che *Contracaecum* sp. è stato segnalato solo sporadicamente come responsabile di patologia nell'uomo (Schaum e Müller, 1967; Ishikura, 2003; Shamsi e Butcher, 2011), forse anche in ragione del fatto che le sue larve raramente sono state repertate nel muscolo dei pesci (Lymbery et al., 2002; Kalay et al., 2009; Penalver et al., 2010). Inoltre, le infestazioni sono spesso asintomatiche, e quindi potrebbero passare inosservate (McKarty e Moore, 2000; Shamsi e Butcher, 2011).

Ulteriori indagini sono necessarie per meglio definire la reale diffusione di questi parassiti negli ospiti definitivi e paratenici/intermedi degli ambienti salmastri della Sardegna, in modo da poterne comprendere meglio la sistematica, l'ecologia ed il ciclo biologico, e valutare quanto possano rappresentare un rischio per il consumatore.

CAPITOLO 4

***ASCOCOTYLE* SP. ED *HETEROPHYES* SPP. (TREMATODA:
HETEROPHYIDAE) NEI MUGGINI (OSTEICHTHYES: MUGILIDAE) DEGLI
STAGNI DELL'ORISTANESE (SARDEGNA, MEDITERRANEO OCCIDENTALE)**

INTRODUZIONE

I principali parassiti dei pesci agenti di zoonosi appartengono alle classi Trematoda (famiglie Echinostomatidae, Heterophyidae ed Opisthorchidae) e Cestoda (famiglia Diphylobothriidae), ed al Phylum Nematoda (famiglie Anisakidae, Capillariidae e Gnathostomatidae). Fra di essi i trematodi rappresentano la maggiore causa di morbilità associata a malattia (Chai et al., 2005; Carlos et al., 2011).

La World Health Organization (WHO) considera le infestioni di origine alimentare sostenute da trematodi un serio e crescente problema di sanità pubblica. È stato stimato che 40 milioni di persone in tutto il mondo siano colpite da questi parassiti, ma il numero di individui realmente a rischio potrebbe essere prossimo al mezzo miliardo (WHO, 2004; Chai et al., 2009). I fattori che contribuiscono all'insorgenza di queste malattie sono da ricercare nella scarsa educazione da parte della popolazione, nel crescente sviluppo dei sistemi di acquacoltura in condizioni di scarsa igiene, e nel consumo di piatti a base di cibo crudo o cotto in maniera inadeguata (Fried e Huffman, 2008).

Globalmente sono state identificate 70 specie di trematodi intestinali in grado di infestare l'uomo, 31 delle quali appartenenti alla famiglia Heterophyidae (Yu et al., 1994).

Sistematica, biologia ed epidemiologia della famiglia Heterophyidae

I trematodi digenei sono parassiti con corpo appiattito dorso-ventralmente, non segmentato, e di forma da ovalare a allungata, muniti normalmente di due ventose (orale e ventrale), variamente conformate. Il corpo è ricoperto da una cuticola esterna che può presentare spine e scaglie. L'apparato digerente è costituito da ventosa orale, prefaringe (che può mancare), faringe, e uno o due ciechi variamente conformati. Sono ermafroditi a parte rare eccezioni, monorchidi o poliorchidi, e la posizione delle gonadi e degli

altri organi varia nelle diverse specie. I vitellogeni sono più o meno sviluppati e le uova, spesso visibili all'interno del corpo, possono essere opercolate.

Sono parassiti a ciclo indiretto, a due o più ospiti intermedi, il primo dei quali è normalmente rappresentato da molluschi, mentre il secondo da pesci o crostacei; gli ospiti definitivi sono vertebrati (pesci, anfibi, rettili, uccelli e mammiferi) (Heejeong, 2009).

La famiglia Heterophyidae

Gli eterofidi, famiglia Heterophyidae (Odhner, 1914), sono piccoli trematodi digenei appartenenti all'ordine Opisthorchiida, superfamiglia Opisthorchioidea, i cui adulti sono stati riscontrati prevalentemente nell'intestino di uccelli e mammiferi mentre le metacercarie nei pesci. Questa famiglia è suddivisa in 5 sottofamiglie: Heterophyina, Centrocestinae, Cercarioidinae, Haplorchinae, Adleriinae. Le sottofamiglie Heterophyinae e Centrocestinae comprendono specie d'interesse zoonosico presenti anche nelle acque dolci e salmastre del territorio italiano.

Le specie appartenenti alla sottofamiglia Heterophyinae (Figura 4.1) presentano le seguenti caratteristiche: corpo piriforme; prefaringe ed esofago ben evidenti; ventosa ventrale situata al centro del corpo; testicoli leggermente obliqui rispetto l'asse del corpo; ovario nella linea mediana anteriore ai testicoli; ricettacolo seminale e vitellogeni posteriori all'ovario; utero in posizione mediana tra testicoli e ventosa ventrale; vescicola seminale divisa in tre porzioni; dotti maschili e femminili riuniti in un unico dotto ermafroditico che si apre all'estremità del gonotile; quest'ultimo, quando eretto, ha forma di fungo e nel margine libero è armato da una corona di spine; vescica escrettrice a forma di Y che giace tra testicoli e ricettacolo seminale. La sottofamiglia Heterophyinae è divisa in due gruppi (Witenberg, 1928): Heterophyina (i vitellogeni non si estendono anteriormente oltre il livello dell'ovario), comprende i generi *Diorchitrema*, *Dexiogonimus*, *Heterophyes*, *Metagonimus*, *Stictodora*, *Galactosomum*, *Microlistrum*; e *Cryptocotyle* (i vitellogeni si estendono

anteriormente all'ovario), comprende i generi *Cryptocotyle*, *Tocotrema*, *Rossicotrema*, *Aphallus*.

Del genere *Heterophyes* sono state descritte 4 specie: *Heterophyes heterophyes* (Siebold, 1852), *Heterophyes dispar* Looss, 1902, *Heterophyes aequalis* Looss, 1902, e *Heterophyes nocens* Onji, 1915.

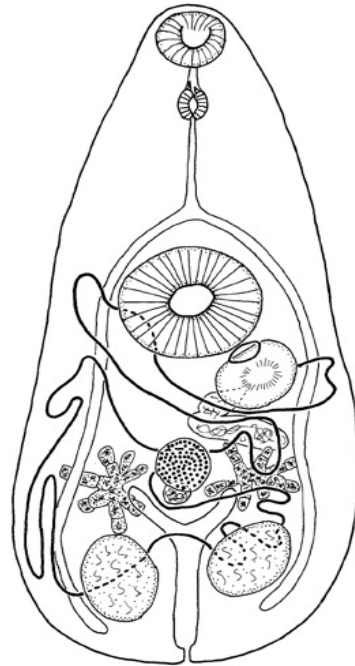


Figura 4.1. Sottofamiglia Heterophyinae, *Heterophyes nocens*, parassita adulto. Da Onji e Nishio (1916).

La sottofamiglia Centrocestinae (Figura 4.2) comprende specie con corpo allungato anteriormente e arrotondato posteriormente; l'apertura orale è circondata da un numero variabile di spine; la ventosa orale presenta, in alcuni generi, un'appendice craniale a forma di lingua ed una caudale conica; i due testicoli sono situati caudalmente agli altri organi riproduttivi. Sono presenti cinque generi, suddivisi in due gruppi a seconda del grado di sviluppo dei vitellogeni. Nei generi *Pygidiopsis* e *Parascocotyle* i vitellogeni non si estendono anteriormente all'ovario, mentre in *Centrocestus*, *Stamnosoma* ed *Ascocotyle* i vitellogeni raggiungono anteriormente l'apertura genitale. Al genere *Ascocotyle* appartengono i sottogeneri *Ascocotyle* (doppia corona di spine circumorali;

esofago assente) e *Phagicola* (singola corona di spine circumorali; esofago presente) (Witenberg, 1928; Neveu-Lemaire, 1936; Pearson, 2008).

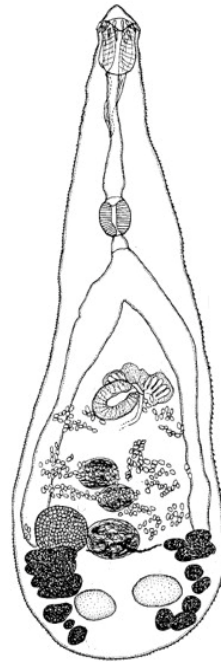


Figura 4.2. Sottofamiglia Centrocestinae, *Ascocotyle (Phagicola) longa*, parassita adulto. Da Scholz (1999).

Principali caratteri morfologici degli eterofidi

Sono di seguito descritti i principali caratteri morfologici degli eterofidi allo stadio adulto e delle metacercarie secondo le indicazioni di Witenberg (1928) e Pearson (2008).

Adulto (Figure 4.1 e 4.2)

I parassiti adulti possono avere il corpo da tondeggiante a piriforme e lunghezza variabile (200-7.000 μm). La porzione anteriore ha forma appiattita ed è mobile, il tegumento è armato da scaglie ctenoidi e può presentare delle pigmentazioni granulari. La porzione posteriore, che ha forma ovalare e contiene l'apparato genitale, ha scaglie simili a spine.

La ventosa orale può essere provvista di tutte o alcune delle seguenti strutture: labbra contrattili, appendice posteriore a forma di imbuto, corona di spine circumorali.

Lunghezza e forma di prefaringe ed esofago variano a seconda dei generi e delle specie. Il faringe è sempre presente come anche la ventosa ventrale che, ad eccezione del genere *Heterophyes*, può essere ridotta e inclusa nel seno genitale (sacco ventro-genitale). I ciechi intestinali sono due, di lunghezza variabile, e raramente presentano diverticoli.

Gli organi genitali, ad eccezione dei vitellogeni in alcuni generi, sono raggruppati nella porzione posteriore del corpo, caudalmente all'apertura genitale che è generalmente situata in posizione mediana rispetto al corpo.

I testicoli, singoli o doppi, sono simmetrici e possono avere forma globulare o lobata. Il pene è assente. La vescicola seminale è voluminosa e può essere bi o tripartita. La porzione terminale della vescicola seminale può formare una porzione separata, generalmente provvista di parete chitinoso, detta "espulsore".

L'ovario di forma globosa o lobulare, è normalmente situato anteriormente ai testicoli. Il ricettacolo seminale è ben sviluppato ed ha forma canalicolare. I vitellogeni sono solitamente situati nella porzione posteriore del corpo, ma possono estendersi fino alla porzione anteriore; il loro grado di sviluppo varia con le specie. L'utero normalmente non si estende anteriormente all'apertura genitale. Quest'ultima, che raramente presenta pori separati per i due sessi, si apre all'interno del sacco ventro-genitale (ad eccezione di *Heterophyes*), situato sulla linea mediana del corpo o spostato lateralmente. Vicino all'apertura genitale è spesso presente un gonotile, più o meno sviluppato, che può essere provvisto di spine.

Le uova, di solito numerose, sono opercolate, con guscio sottile e lunghe 22-57 μm . La vescica escrettrice può essere sacciforme, tubulare, a forma di V o di Y; la forma del peduncolo varia nei generi e può essere diritto, a forma di S o

diviso in due branche che possono riunirsi; le branche possono essere lunghe, corte o assenti.

Metacercaria (Figura 4.3)

Le metacercarie sono molto simili tra le varie specie, e alcuni caratteri morfologici dei parassiti adulti sono già riscontrabili a questo stadio. Nei preparati a fresco è possibile distinguere le ventose, il gonotile, il faringe e la vescica escrettrice, mentre nei preparati colorati sono evidenziabili anche gli abbozzi degli organi genitali.

Il parassita all'interno della cisti è avvolto su se stesso; la porzione anteriore del corpo è appiattita mentre quella posteriore è arrotondata. La larva excistata è lunga da 200 a 400 μm e si muove lentamente cambiando continuamente forma (di lingua quando completamente distesa, di cuore quando retratta). L'intera superficie del corpo è disseminata di numerose masserelle di pigmenti brunastri ed in alcune specie i tre quarti anteriori sono ricoperti di scaglie simili a spine.

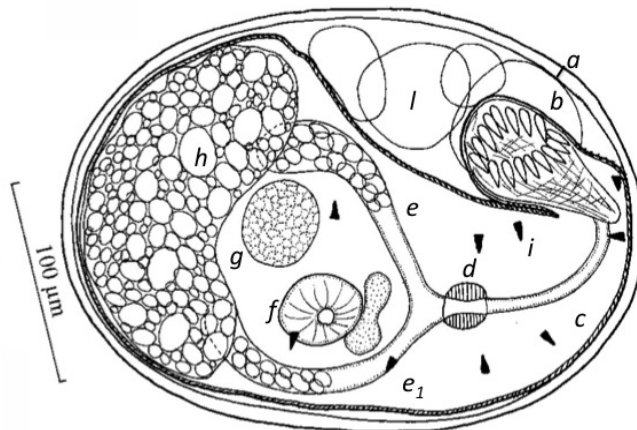


Figura 4.3. *Ascocotyle (Phagicola) longa*. Metacercaria: parete (a); ventosa orale (b); prefaringe (c); faringe (d); ciechi intestinali (e, e₁); ventosa ventrale (f); ovario (g); vitellogeni (h); pigmenti (i); riserve (l). Da Scholz (2001).

Ciclo biologico (Figura 4.4)

Tutti gli eterofidi hanno un ciclo biologico simile (Figura 4.4). I parassiti adulti vivono nell'intestino degli ospiti definitivi (O.D.) vertebrati (uccelli e mammiferi) (Figura 4.4.7-8). Qui depongono le uova ad uno stadio variabile (da non embrionato a miracidium in formazione) che vengono emesse nell'ambiente esterno con le feci (Euzaby, 1975) (Figura 4.4.1). Queste raggiungono l'ambiente acquatico (acqua dolce o salmastra a seconda della specie), ove il parassita viene ingerito dal mollusco gasteropode primo ospite intermedio (O.I.) (Figura 4.4.2), all'interno del quale libera il miracidium che si moltiplica in maniera asessuata dando origine alla sporocisti e a una o due generazioni di redie, prima di generare numerose cercarie (Paperna e Overstreet, 1981; Muller, 2001) (Figura 4.4.2a-c).

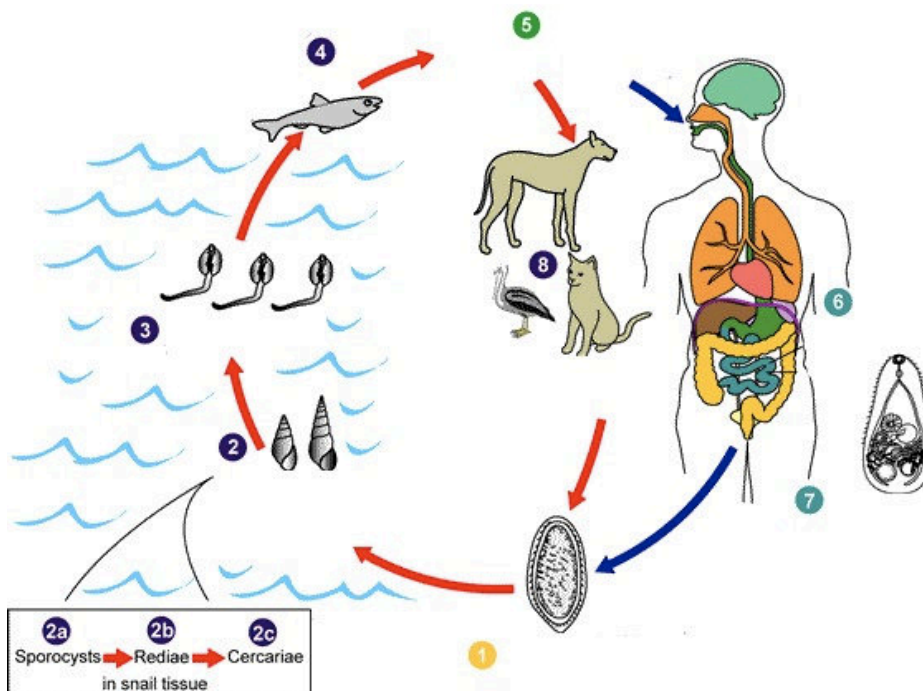


Figura 4.4. Ciclo biologico degli eterofidi. Per l'interpretazione dei numeri vedi testo. Da Centers for Disease Control and Prevention (<http://www.cdc.gov>).

Le cercarie sono lofocerche gimnocefale, cioè munite di una membrana natatoria longitudinale lungo la coda e con la porzione anteriore inerme (Euzeby, 1975). Le cercarie emergono 3-4 settimane dopo l'ingestione delle uova, migrano attraverso i tessuti dell'ospite e lo abbandonano (Muller, 2001) (Figura 4.4.3). È stato stimato che un gasteropode infestato può produrre sino a 500 cercarie al giorno, tutte infestanti per il secondo O.I. (Khalil, 1933).

Una volta nell'ambiente acquatico, le cercarie invadono il secondo O.I. (varie specie ittiche) (Figura 4.4.4) incapsulandosi sotto le scaglie o migrando verso tessuti specifici (muscolatura, rene, cuore, branchie) ed evolvono a metacercarie (Dzilowski et al., 2013). Queste ultime diventano infestanti dopo circa 15-21 giorni. Non è ancora chiaro quanto tempo la metacercaria sopravviva nel pesce, e sarebbero utili studi per chiarire tale aspetto al fine di comprendere meglio l'epidemiologia e la biologia di questi parassiti (Elsheikha, 2008a). Secondo vari autori le metacercarie rimangono vitali per 9-13 gg nel pesce refrigerato e 7-8 gg in quello salato (Khalil, 1933; Euzeby, 1975; Muller, 2001). Quando l'O.D. ingerisce il pesce infestato (Figura 4.4.5), le metacercarie si liberano della parete e raggiungono l'intestino (Figura 4.4.6), ove sviluppano allo stadio adulto in 15-20 giorni, sopravvivendo per circa 2 mesi (Muller, 2001).

Le differenze principali nell'ambito dei generi riguardano soprattutto la specificità dei parassiti verso gli ospiti intermedi (Kino et al., 2006). *Pirenella conica* (Mediterraneo Orientale e Meridionale, Mar Rosso, Golfo Persico) e *Cerithidea cingulata* (Asia Orientale) sono il primo O.I. di *Heterophyes* spp. (Taraschewski, 1984). I muggini (in particolare *Mugil cephalus*) rappresentano il più importante secondo O.I. (Paperna e Overstreet, 1981), anche se sono state riscontrate metacercarie in altri pesci eurialini e marini, quali Serranidae, Cichlidae, Carangidae, Cyprinidae, Soleidae e Sciaenidae (Witenberg, 1929; Wells e Randal, 1956; Elsheikha, 2008b).

Il primo O.I. dei trematodi del genere *Metagonimus* è rappresentato anche in questo caso da un gasteropode acquatico (*Semisulcospira* spp.); il secondo O.I. da pesci d'acqua dolce quali salmonidi e ciprinidi (Muller, 2001; P.A.H.O., 2003).

Le specie del genere *Ascocotyle* hanno come primo O.I. molluschi gasteropodi acquatici (*Heleobia* spp. e *Littoridina* spp.) e come secondo O.I. pesci d'acqua salmastra della famiglia Mugilidae (Scholz, 1997; Simoes et al, 2010).

Epidemiologia

Allo stadio adulto trematodi della famiglia Heterophyidae sono parassiti intestinali di uccelli ittiofagi e mammiferi (uomo incluso), le cui metacercarie si localizzano in differenti organi e tessuti dei pesci. (Chai et al., 1986; Chai e Lee, 2002; Heejeong, 2009; Dzikowski, 2013). L'O.D. si infesta attraverso l'ingestione di pesci d'acqua dolce (e.g. *Metagonimus* spp.) e salmastra (e.g. *Heterophyes* spp.) infestati da metacercarie, le quali rappresentano un riconosciuto pericolo nelle comunità dove per tradizione si consuma pesce crudo o poco cotto (Dung et al., 2007). Il Sud-Est Asiatico, in particolare in Corea, Cina, Thailandia, Vietnam, Filippine, Indonesia e India (Chai et al., 2009), è una delle zone dove l'eterofidosi è particolarmente diffusa (FAO, 2010). In questi paesi i settori della pesca e dell'acquacoltura rivestono un ruolo importante sia per il consumo familiare sia per l'esportazione. Anche se sono state condotte numerose campagne per informare le popolazioni sul rischio legato al consumo di pesce crudo o poco cotto, tuttavia la prevalenza di queste zoonosi rimane alta (Dung et al., 2007).

Elevati livelli di infestazione di eterofidi nei pesci e nell'uomo sono stati segnalati anche nei paesi del Sud del Mediterraneo, quali Tunisia, Egitto, Turchia e Israele, con prevalenze intorno al 90% nei muggini venduti nei mercati locali (Paperna e Overstreet, 1981). La maggior parte dei cani e dei gatti inoltre sembrerebbe essere infestata da *H. heterophyes*, oltre che da altri eterofidi, anche se non tutti di interesse zoonosico (Witenberg, 1929; Paperna e Overstreet, 1981). L'eterofidosi umana è endemica in Israele ed Egitto, e rappresenta un serio problema di sanità pubblica nell'area del Delta del Nilo. In questa zona esistono condizioni favorevoli per la diffusione della parassitosi, quali l'abbondanza degli ospiti intermedi, la pratica della pesca e dell'acquacoltura in condizioni di scarsa igiene, lo smaltimento di reflui nei fiumi

e stagni, l'abitudine al consumo di pesce salato o inadeguatamente trattato, tanto nelle comunità rurali che in quelle urbane. Alcuni studi hanno rilevato un'alta prevalenza nelle donne, soprattutto casalinghe, e pescatori. Queste categorie sembrano essere più esposte alla malattia in seguito alla manipolazione e degustazione di pesce crudo durante la lavorazione e la cottura (Paperna e Overstreet, 1981; Lobna et al., 2010). Inoltre, fra i pescatori egiziani è pratica comune, soprattutto durante attività di pesca, grigliare il pesce su rametti di legno e rimuoverlo prima che sia bruciato esternamente, il che garantisce temperature massime di 54°-61° C all'interno del pesce, con metacercarie vive nel 20-30% dei campioni (Hamed e Elias, 1970).

Le principali specie di eterofidi zoonotici presenti nei pesci delle acque dolci e salmastre italiane, ed in particolar modo in quelle sarde, appartengono ai generi *Heterophyes* e *Phagicola* (Alessandrini, 1906; Nardi, 1959; Deiana, 1961; Nieddu e Lochi, 1988; Scala et al., 1991; Merella et al., 2004).

Heterophyes heterophyes è la specie predominante nei muggini del Mediterraneo, soprattutto quello orientale, e la parassitosi è endemica in Egitto; è stata segnalata anche in Asia Meridionale, Turchia, Balcani e Spagna (P.A.H.O., 2003). Fu riscontrata per la prima volta nell'intestino di un uomo in Egitto (Siebold, 1852). Chai et al. (1986) descrissero due casi di eterofidiosi umana riguardanti due viaggiatori coreani che si erano alimentati di pesce crudo durante una permanenza in Arabia Saudita. I pazienti risultarono affetti da un'infestazione mista da *H. heterophyes* e *H. dispar*. In Egitto le infestazioni umane da *H. heterophyes* sono prevalenti nelle regioni del Delta del Nilo (Lobna et al., 2010). Sono stati riportati anche casi in Giappone (Kagei et al., 1980) e Corea, anche se questi sembrano importati dall'Egitto e dall'Arabia Saudita (Chai et al., 1986; Chai e Lee, 2002).

Heterophyes dispar e *H. aequalis* sono distribuite nel Mediterraneo, Estremo Oriente ed Egitto. *H. dispar* fu repertato per la prima volta nell'intestino di cani e gatti in Egitto (Looss, 1902). Altri autori la riportano in un'ampia varietà di carnivori, inclusi volpi e lupi (Ransom, 1920; Witenberg, 1929; Wells e Randall,

1956; Taraschewski, 1984, 1985). Come precedentemente accennato, il primo caso umano provocato da *H. dispar* risale al 1986, evidenziato contemporaneamente a *H. heterophyes* (Chai et al., 1986, 2002). Per quanto riguarda *H. aequalis*, Chai et al. (1986) hanno descritto un solo caso umano, sempre in un'infestazione mista con *H. heterophyes*. *Heterophyes dispar* e *H. aequalis* sembrano essere di scarso interesse zoonosico, ed hanno ricevuto scarsa attenzione da parte dei parassitologi (Taraschewski, 1987).

Heterophyes nocens è distribuito prevalentemente in Estremo Oriente (Giappone e Corea). Fu descritto per la prima volta in Giappone in cani e gatti infestati sperimentalmente con metacercarie prelevate da *M. cephalus* (Chai e Lee, 2002). In Giappone, Corea e Cina sono riportati elevati livelli d'infestazione umana nelle comunità ove sono consumati muggini crudi (Onji, 1915; Asada, 1928).

Ascocotyle (Phagicola) longa è largamente riscontrata in Sud America, Europa, Africa e Medio Oriente. In Sud America la fagicolosi è una zoonosi la cui fonte d'infestazione è rappresentata da pesci d'acqua salmastra, in particolare quelli della famiglia Mugilidae, e costituisce un problema di sanità pubblica (Rim et al., 1994). Chieffi et al. (1990, 1992) riportano casi di eterofidiosi umana causati da *A. (P.) longa* in Brasile. Antunes et al. (1994) descrivono 10 casi contratti in seguito al consumo di muggini crudi a San Paolo (Brasile). In natura i parassiti adulti sono stati riscontrati nell'intestino di uccelli ittiofagi e mammiferi, e le metacercarie principalmente nei muggini (Scholz, 1999). Simoes et al. (2010) riportano un'alta prevalenza di metacercarie nella muscolatura di *Mugil liza* a San Paolo. Gli stessi autori, considerando il gran numero di ristoranti orientali che servono pesce crudo (sashimi, sushi) nelle grandi città brasiliane ritengono che l'impatto di *A. (P.) longa* sulla sanità pubblica sia sottostimato. Portes Santos et al. (2013) confermano l'elevata prevalenza di metacercarie di *A. (P.) longa* (87%) nella muscolatura di *M. liza* nella città di Rio de Janeiro. In Argentina, Martorelli et al. (2012) riscontrano per la prima volta questa specie di eterofide in *M. liza* negli estuari di Rio de La Plata e Bahía Blanca. In Messico le

metacercarie di eterofidi rappresentano il gruppo predominante di trematodi dei pesci (Scholz et al., 2000). Scholz (1997) descrive metacercarie e adulti di *Ascocotyle* sp. isolati rispettivamente da pesci e O.D. infestati sia naturalmente che sperimentalmente nella Penisola dello Yucatàn.

In Italia, Alessandrini (1906) descrive per la prima volta la specie *Phagicola italica* in cuccioli di cane alimentati con lucci pescati nel lago di Bracciano. Il parassita fu poi repertato da Witenberg (1929) in cani e gatti dell'Egitto e di Israele, da Nardi (1959) in cani e volpi della provincia di Foggia, e da Deiana (1961) in un cane di Alghero (Sardegna). Scala et al. (1991) repertano metacercarie di *Phagicola* sp. nel miocardio e muscolatura addominale di *M. cephalus* e *L. aurata* dello stagno di Calik (Alghero, Sardegna). Delle tre specie di *Heterophyes* presenti nel Mediterraneo (*H. heterophyes*, *H. dispar* e *H. aequalis*) le prime due sono state riscontrate in mugilidi e cani della Sardegna (Deiana, 1961; Nieddu e Lochi, 1988). Merella et al. (2004) riportano un'elevata infestazione di metacercarie ascrivibili ai generi *Ascocotyle* e *Heterophyes* in mugilidi degli stagni di Cabras e Mistras (Sardegna, Mediterraneo occidentale). La mancanza di dati relativi a infestazioni umane in Sardegna potrebbe essere attribuita alle preparazioni tradizionali dell'Isola, quali muggine arrosto e bollito (*mreca*), che garantiscono elevate temperature, sufficienti per la devitalizzazione delle metacercarie (Merella et al., 2004). In ogni caso è anche possibile che l'infestazione umana da eterofidi passi inosservata dal momento che i sintomi non sono patognomonic, e che la patologia si manifesta solo quando l'infestazione è sostenuta da un elevato numero di parassiti (Muller, 2001).

Eterofidosi

L'eterofidosi è una zoonosi causata da forme adulte di trematodi della famiglia Heterophyidae. L'infestazione dell'uomo avviene in seguito al consumo di pesci crudi o impropriamente preparati infestati da metacercarie, da cui sviluppano gli adulti che vivono adesi alla mucosa e alle cripte del Lieberkühn nella regione prossimale dell'intestino tenue (Fried et al., 2004). Questo tratto dell'intestino è il sito d'elezione in cui i parassiti sono stati riscontrati anche uno o due mesi dopo l'infestazione. Comparando il sito d'attacco dei parassiti immaturi (3 giorni post infestazione, g.p.i.) con quello degli adulti sessualmente maturi (10-120 g.p.i.), sembrerebbe che, a causa della motilità intestinale, i primi vengano trasportati passivamente nelle porzioni posteriori dell'intestino (Taraschewski, 1984).

Questa parassitosi evolve generalmente in maniera asintomatica o con sintomi lievi come dolore e coliche addominali, diarrea cronica talvolta emorragica, nausea e vomito (Ko et al., 2006). In qualche caso è stata riscontrata eosinofilia. Tale sintomatologia, che può complicarsi causando necrosi superficiale della mucosa intestinale, è riscontrabile solo quando l'infestazione è sostenuta da un elevato numero di parassiti (> 4000, Muller, 2001). Le manifestazioni cliniche sembrano essere correlate sia con l'intensità dell'infestazione sia con il grado d'immunità del paziente.

Il quadro istopatologico è caratterizzato da lesioni della mucosa intestinale di grado variabile secondo l'intensità dell'infiammazione, atrofia dei villi e iperplasia (Chi et al., 1988). Per quanto riguarda le infestazioni da *Metagonimus yokogawai*, i parassiti sono stati riscontrati sia liberi nel lume intestinale sia negli spazi intervillosi. Altre osservazioni riportano quadri caratterizzati da infiltrazioni di linfociti, plasmociti ed eosinofili a livello di stroma, erosione degli enterociti circostanti, deplezione delle cellule mucipare caliciformi, e occasionalmente, edema dei villi intestinali (Chi et al., 1988).

Sono stati riportati casi di parassitismo erratico, spesso fatale, da parte di alcune specie di eterofidi (*Haplorchis* spp., *Stellantchasmus* spp., *Procerovum* spp.), nel cuore, cervello, midollo spinale (Africa et al., 1940). Alcuni autori riportano casi di granulomi presumibilmente dovuti a *H. heterophyes* nel cervello (Gallais et al., 1956; Collomb et al., 1960) e complicazioni di tipo polmonare sempre riconducibili a questa specie (Gomaa, 1962). Chai et al. (1984) riferiscono di un caso d'infestazione intestinale sostenuta da *H. nocens* con complicanze cardiache. Occasionalmente le uova dei parassiti possono entrare nel torrente linfatico attraverso le cripte del Lieberkühn e arrivare al sistema circolatorio provocando occlusione vasale (Fried et al., 2004). Le lesioni cardiache causate da *Heterophyes* spp. o altri membri della stessa famiglia sono caratterizzate da fibrosi del tessuto circostante le uova a livello della valvola mitralica e del miocardio con conseguente insufficienza cardiaca (Muller et al., 2001). Nelle Filippine il 15% dei casi di miocardite fatale viene attribuito alle uova di questi parassiti (García et al., 1997).

L'immunosoppressione è uno dei fattori correlati con la disseminazione dei parassiti in siti ectopici. Patologie come malnutrizione e/o malassorbimento secondari a ischemia dei villi intestinali e distruzione degli enterociti indurrebbero una riduzione dell'immunità mucosale dell'ospite, creando le condizioni ottimali per l'attraversamento della parete intestinale e il passaggio nel torrente circolatorio da parte dei parassiti (Elsheikha et al., 2007).

Le infestazioni umane sono spesso trascurate o diagnosticate tardivamente, in quanto i sintomi non sono patognomonic, e la patologia si manifesta solo nelle infestazioni massive. Inoltre spesso le uova di questi trematodi vengono confuse con quelle di trematodi epatici (Muller, 2001). La diagnosi si basa sull'osservazione microscopica delle uova dei parassiti in campioni fecali (esame copromicroscopico). L'identificazione di queste a livello di specie è difficoltosa a causa della somiglianza per forma e dimensioni, mentre i trematodi adulti possono essere differenziati dopo eliminazione fecale seguita a trattamento antielmintico (Dzikowski et al., 2013).

Farmaco d'elezione per il trattamento di questa parassitosi è il Praziquantel (Chieffi, 1992; Chai et al., 2002). Per quanto riguarda la posologia e il dosaggio esistono pareri discordanti, infatti Chieffi (1992) riferisce come efficace la dose unica di 50 mg/kg, Chai et al. (2002) riportano 10-20 mg/kg sempre in dose unica, mentre Fried e Huffman (2008) 15-40 mg/kg.

MATERIALI E METODI

La presente indagine è finalizzata a valutare la presenza di metacercarie di eterofidi d'interesse zoonosico nei muggini dello Stagno di Mistras (Figura 4.5). Precedenti studi hanno messo in evidenza in questa località la presenza di metacercarie morfologicamente ascrivibili a questi parassiti (Marino, 2003; Merella et al., 2004).

Per avere un quadro della diffusione di questi parassiti anche in altre località della Sardegna sono stati effettuati campionamenti puntiformi in altri due stagni dell'Isola: Stagno di Calik (Alghero, Sassari) e Stagno di Marceddì (Terralba, Oristano) (Figura 4.6).

Campionamento

Lo stagno di Mistras

Lo Stagno di Mistras (Figura 4.5) si trova nella parte settentrionale del Golfo di Oristano, appena a sud dello Stagno di Cabras. Ha una superficie di circa 450 ha, dei quali 250 ha coperti in permanenza dall'acqua, ed una profondità media di 30-40 cm. Il limite del bacino è impreciso, a causa del fondo piatto che favorisce l'invaso delle rive dovuto ai cambiamenti del livello delle acque.

La forma dello stagno è allungata e stretta, e corre parallela alla costa. È delimitato verso il mare da due cordoni litorali, uno orientale ed uno occidentale, la spiaggia di Su Siccu. Gli apporti di acque dolci provengono in massima parte dalle precipitazioni atmosferiche, la comunicazione con il mare è garantita da una bocca a mare piuttosto ampia. Questo fa sì che la salinità tenda ad essere simile a quella marina, con dolcificazione limitata in inverno, eccezionalmente può scendere a minimi dell'11‰, e forti sbalzi in estate inoltrata, prima dell'inizio delle piogge, con massimi oltre il 50‰ nelle zone più confinate (De Angelis, 1952). Il valore della temperatura è mediamente alto, dovuto sia al clima mite della Piana del Campidano, che alla mancanza di corsi d'acqua che possono

abbassare la temperatura dei bacini di cui sono immissari (De Angelis, 1952). Ne consegue che l'escursione termica stagionale è piuttosto limitata e si aggira intorno ai 20° C, con valori che oscillano tra 10° C e 30° C.

La laguna, di proprietà privata, è gestita dalla Cooperativa Pescatori Molluschicoltori di Cabras. La produttività è di circa 25 kg/ha, l'elevato grado di marinizzazione fa sì che la produzione sia costituita per circa il 45% da specie pregiate come spigole, orate, saraghi e mormore, oltre che muggini, anguille, ghiozzi, granchi e gamberetti.

La pesca nello stagno viene effettuata sia con arti vagantive (reti da posta, palamiti, bertovelli, nasse, etc.) ma soprattutto nella peschiera. Una peschiera (Figura 4.7) è uno sbarramento fisso, situato in posizione strategica nelle zone di scambio tra mare e laguna, che permette di controllare le migrazioni dei pesci tra i due ambienti, alla ricerca di cibo o di condizioni favorevoli (Merella, 2000). Man mano che le varie specie ittiche si riproducono in mare, il reclutamento si dirige verso le zone costiere, ed in particolar modo verso gli stagni. Qui le porte ad inganno della peschiera ne consentono l'ingresso ma non l'uscita dalla laguna. Quindi, con la marea entrante, i pesci, nel loro nuotare controcorrente, passano dalla laguna alla giostra della peschiera, dove possono essere catturati o con reti a circuizione o nei calici della peschiera.



Figura 4.5. Lo Stagno di Mistras, vista satellitare e estratto tavolette IGM.



Figura 4.6. Altre località di campionamento, con prelievi puntiformi a fine comparativo.

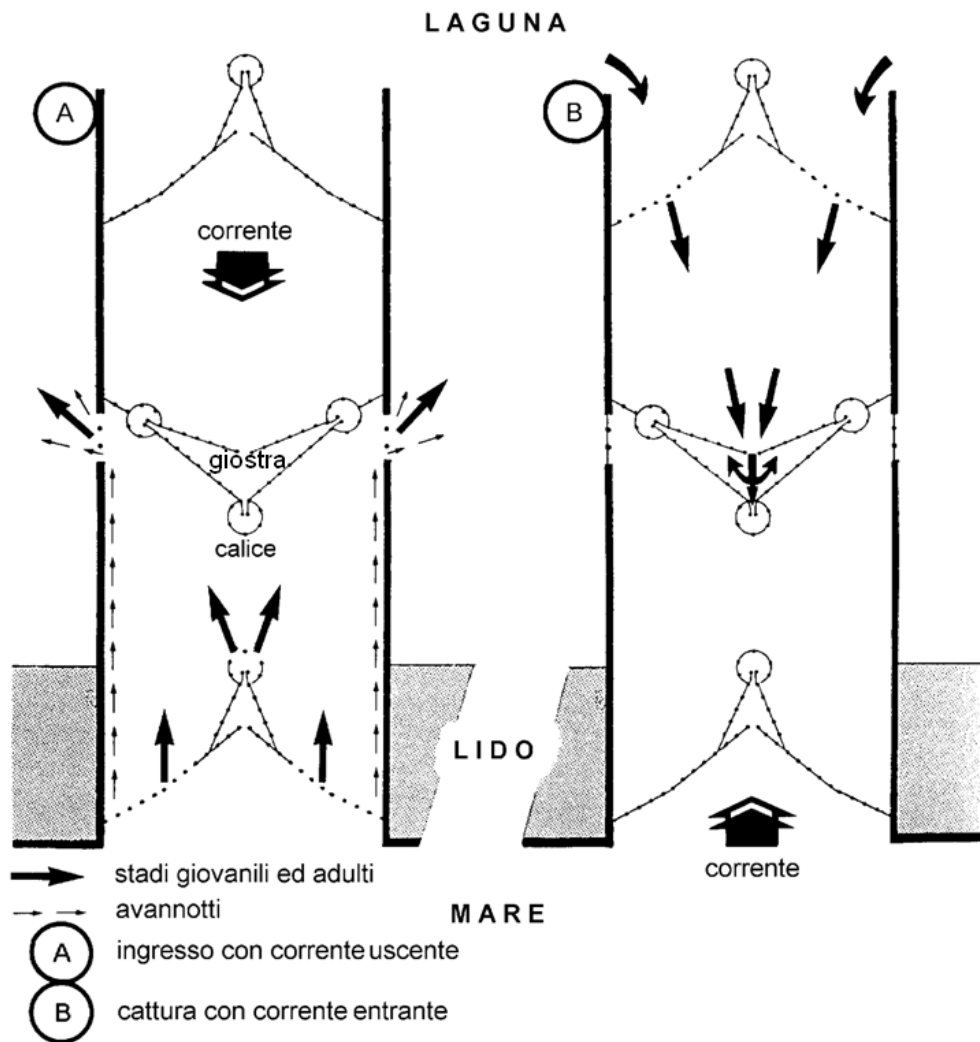


Figura 4.7. Rappresentazione schematica di una peschiera (mod. da C. Chauvet, 1988. FAO Doc. Tech. Pêches, 290).

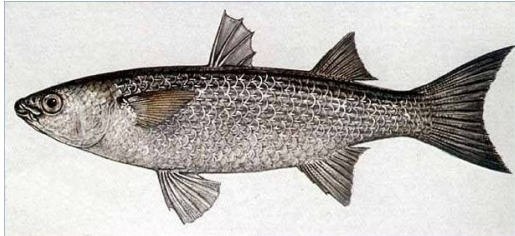
Specie ospite

I muggini sono un'importante famiglia di teleostei cosmopolita appartenente all'ordine dei perciformi. Questi pesci sono ampiamente impiegati per l'alimentazione umana, sia per la buona qualità delle carni che per le loro spiccate caratteristiche di adattabilità agli ambienti lagunari, che ne permettono un agevole sfruttamento estensivo o semi-intensivo nei corpi d'acqua salmastra di tutto il mondo (Nash e Koningsberger, 1981).

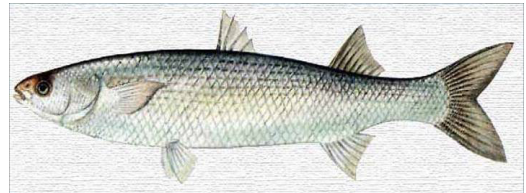
Secondo Bauchot (1987) nel Mediterraneo occidentale sono presenti 6 specie di muggini (Figura 4.8), tutte di aspetto simile, ma riconoscibili in base a caratteri morfologici ed alle chiavi dicotomiche elaborate da numerosi autori (Tortonese, 1975; Farrugio, 1977; Bauchot, 1987), sintetizzate nello schema seguente:

1a. Pinna anale con 11 raggi molli	<i>Oedalechilus labeo</i>
1b. Pinna anale con 8 raggi molli	2
2a. Labbro superiore spesso e con papille	<i>Chelon labrosus</i>
2b. Labbro superiore stretto e privo di papille	3
3a. Palpebra adiposa ben sviluppata che ricopre quasi completamente la pupilla	<i>Mugil cephalus</i>
3b. Palpebra adiposa che non ricopre la pupilla	4
4a. Pinna pettorale corta, che se piegata anteriormente non arriva al margine posteriore dell'occhio	<i>Liza ramada</i>
4b. Pinna pettorale che se piegata anteriormente supera il margine posteriore dell'occhio	5
5a. Scaglie predorsali con 1 solco	<i>Liza aurata</i>
5b. Scaglie predorsali con 2-5 solchi	<i>Liza saliens</i>

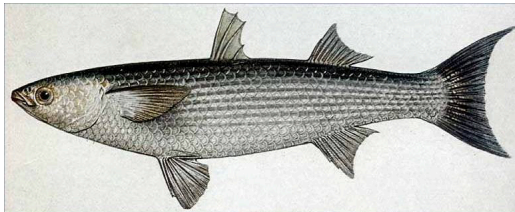
Per l'esecuzione della ricerca sono state prese in considerazione le cinque specie di muggini (famiglia Mugilidae) presenti nelle acque salmastre del Mar Mediterraneo occidentale (Bauchot, 1987): *Chelon labrosus* (Risso, 1827), *Liza aurata* (Risso, 1810), *Liza ramada* (Risso, 1827), *Liza saliens* (Risso, 1810) e *Mugil cephalus* Linnaeus, 1758 (Figura 4.8).



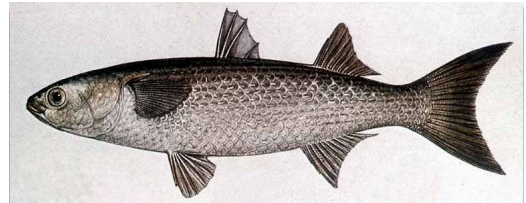
Chelon labrosus (Risso, 1827)



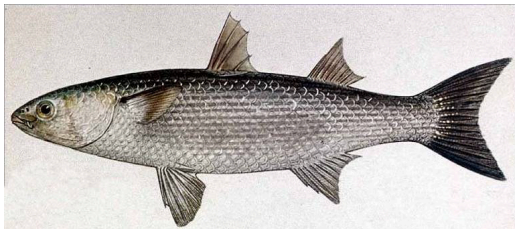
Liza saliens (Risso, 1810)



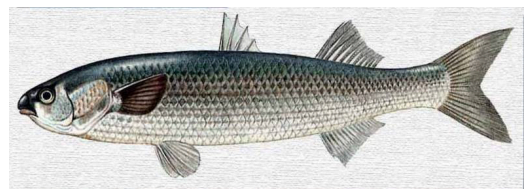
Liza aurata (Risso, 1810)



Mugil cephalus Linnaeus, 1758



Liza ramada (Risso, 1827)



Oedalechilus labeo (Cuvier, 1829)

Figura 4.8 I muggini del Mediterraneo occidentale.

Cattura degli ospiti

I campionamenti nello Stagno di Mistras sono stati effettuati tra marzo 2012 e gennaio 2013, nel corso dei quali sono stati prelevati complessivamente 60 esemplari di mugilidi (51 nel 2012 e 9 nel 2013). Per quanto riguarda i campionamenti puntiformi in altre località dell'Isola, sono stati prelevati 11 esemplari. Nella tabella 4.I è riportato il numero di campioni relativo a ciascuna specie esaminata per ogni località.

Tabella 4.I. Numero di campioni esaminati per ciascuna specie ospite.

Località	<i>C. labrosus</i>	<i>L. aurata</i>	<i>L. ramada</i>	<i>L. saliens</i>	<i>M. cephalus</i>
Calik		1	6		
Marceddì			4		
Mistras	13	18	6	8	15
Totale	13	19	16	8	15

Immediatamente dopo la pesca nei lavorieri della peschiera (Figura 4.9) i pesci sono stati identificati a livello specifico, confezionati singolarmente in sacchetti di plastica e posti in una borsa termica refrigerata per il trasporto in laboratorio.

Indagine parassitologica

In laboratorio sono state verificate, per ogni esemplare, l'identificazione di specie ospite, e rilevate la lunghezza totale (dall'estremità del muso all'estremità della pinna caudale) e quella standard (dall'estremità del muso al peduncolo caudale), mediante ittiometro, con la precisione di 1 mm. Il peso totale e quello eviscerato sono stati rilevati con bilancia digitale, con la precisione di 0,1 g.



Figura 4.9. Pesca nei lavorieri della peschiera Mistras.



Figura 4.10. Prelievo di aliquota di 50 g da un esemplare ospite.

Successivamente si è proceduto alla spellatura e dissezione dei soggetti, prelevando un'aliquota di 50 g di muscolo (Figura 4.10), o l'intera muscolatura per quelli di peso ≤ 50 g, che è stata sottoposta a digestione cloridopeptica, adattata in base alle metodiche di Thu et al. (2007) e Phan et al. (2010), riassunta di seguito:

Materiale da laboratorio

- setacci (maglia 1 mm e 80 μm)
- agitatore magnetico con piastra riscaldante
- beaker 500 ml
- ancoretta magnetica

Reagenti chimici

- pepsina 2000 FIP-U/g
- acido cloridrico 37%
- soluzione fisiologica 0,9%

Metodica

- eviscerare, spellare, sfilettare e sminuzzare il muscolo;
- pesare la quantità necessaria da digerire (aliquota 50 g o pesce intero);
- versare in un beaker la quantità necessaria di soluzione 0,1% di pepsina e 0,06 M HCl in soluzione fisiologica 0,9% (250 ml di soluzione per 50 g di muscolo);
- porre l'aliquota di muscolo nella soluzione;
- mantenere in agitazione alla temperatura di 37° C per 2-3 ore;
- filtrare mediante i setacci con maglia 1 mm e 80 μm (il primo setaccio trattiene il materiale grossolano e lascia passare le particelle di piccole dimensioni, tra cui le metacercarie che vengono trattenute dal secondo setaccio);
- trasferire il materiale raccolto in calici da 250 ml con soluzione fisiologica 0,9% e lasciar sedimentare per 30 min;
- versare poco per volta in capsula di Petri e osservare allo stereomicroscopio per la ricerca delle metacercarie.

Identificazione morfologica dei parassiti

In base alle caratteristiche morfologiche macroscopiche (forma, dimensioni, strutture interne osservabili), le metacercarie sono state suddivise in quattro gruppi (sferiche, ellissoidali grandi, ellissoidali piccole, spinose), contate e conservate a 4° C in soluzione fisiologica 0,9%, per essere in seguito esaminate per una caratterizzazione morfologica e molecolare.

Si è quindi proceduto all'allestimento di preparati a fresco e con soluzione di glicerina e acido picrico (GAP) secondo la metodica descritta da Scholz et al. (2000) e riassunta di seguito:

- preparare la soluzione fissante con glicerina e acido picrico (GAP) in rapporto 1:1;
- posizionare la metacercaria (integra o excistata) su un vetrino portaoggetto con una goccia di soluzione salina 0,9%;
- posizionare un coprioggetto sul parassita e fissarne gli angoli con 4 gocce di smalto;
- porre una goccia di GAP al lato del coprioggetto, ed attendere la diffusione per capillarità al suo interno.

I preparati così realizzati sono stati osservati al microscopio ottico per il riconoscimento delle caratteristiche morfometriche dei parassiti, sia integri che excistati, in base alle descrizioni di Witenberg (1928), Yamaguti (1971), Pearson (1973), Scholz (1997; 2001) e Culurgioni et al. (2007). Le metacercarie sono state fotografate con un sistema microfotografico digitale, sia in toto che a forte ingrandimento per esaminare in dettaglio le strutture d'interesse per l'identificazione morfologica. Alcuni esemplari sono stati disegnati alla camera lucida. Le indagini morfometriche hanno riguardato i seguenti 15 caratteri (Figura 4.3): spessore della parete, lunghezza e larghezza della metacercaria, parassita excistato, ventosa orale, ventrale e genitale, faringe, lunghezza di prefaringe ed esofago. I preparati così allestiti sono stati contrassegnati e opportunamente archiviati.

I parassiti osservati a fresco sono stati successivamente fissati in etanolo assoluto e conservati in microprovette da 1,5 ml per le indagini biomolecolari.

Infestazione sperimentale

Presso i laboratori dell'Istituto di Parassitologia Biology Centre of the Academy of Sciences della Repubblica Ceca è stata effettuata un'infestazione sperimentale di un criceto (*Mesocricetus auratus*) con 300 metacercarie del tipo sferico repertate in un esemplare di *M. cephalus* di Mistras. Queste, diluite in 2 ml di soluzione fisiologica, sono state somministrate al criceto con l'ausilio di una siringa munita di una piccola sonda.

Dieci giorni dopo l'infestazione il criceto è stato sacrificato con metodo umanitario. Il suo intestino è stato isolato, dissezionato, risciacquato in soluzione fisiologica e dopo sedimentazione il liquido di lavaggio è stato esaminato allo stereomicroscopio per la ricerca degli adulti di eterofidi.

Una parte degli esemplari adulti repertati sono stati montati con soluzione fisiologica in preparati temporanei su vetrino portaoggetti. I parassiti in toto e le principali strutture anatomiche sono stati fotografati e disegnati alla camera lucida per l'identificazione morfologica. Gli stessi esemplari sono stati quindi conservati in etanolo assoluto per essere sottoposti ad analisi molecolare. La parte restante dei parassiti repertati è stata fissata con formalina calda e quindi in etanolo 70% per essere colorata con carminio cloridrico secondo la metodica di seguito descritta:

- Immergere il parassita nella soluzione di carminio cloridrico per 15 minuti;
- Risciacquare in etanolo 70%;
- Immergere in etanolo acido per circa 20 minuti;
- Disidratare nella scala degli alcoli sino ad etanolo assoluto;
- Chiarificare in olio di chiodi di garofano 10% per 10 minuti;
- Chiarificare in olio di chiodi di garofano 50% per 10 minuti;
- Chiarificare in olio di chiodi di garofano 90% per 10 minuti;
- Chiarificare in olio di chiodi di garofano 100% per 30 minuti;
- Montare il parassita su un vetrino portaoggetti con balsamo del Canada.

Analisi molecolare

Prima dell'estrazione del DNA da ciascun parassita precedentemente identificato morfologicamente, fotografato e catalogato, si provvedeva a rimuovere con l'ausilio di micropipetta la maggior quantità possibile di etanolo 70% dalla microprovetta. La parte di etanolo rimanente veniva eliminata lasciando evaporare in stufa a 57° C per 15-20 minuti.

Per l'estrazione degli acidi nucleici è stato utilizzato il BT Chelex® 100 Resin BIO-RAD (USA). La soluzione del Chelex è stata preparata aggiungendo 2,5 g di Chelex a 50 ml di acqua milliQ (mq) sterile. La metodica di estrazione utilizzata è la seguente:

- Agitare bene la soluzione di Chelex prima di ciascun utilizzo, in modo che le piccole sfere che si trovano nella soluzione siano in sospensione. Aggiungere 200 µl di soluzione in ciascuna provetta;
- Aggiungere 2 µl di proteinasi K (10 mg/ml) per ciascun campione;
- Incubare a 56°C per 3 ore;
- Vortexare;
- Incubare a 90° C per 8 minuti;
- Vortexare;
- Centrifugare per 10 minuti a 15.000 rpm.

In seguito alla centrifugazione il DNA si localizza nella porzione più superficiale della soluzione. Il DNA ottenuto è stato conservato a -20°C.

PCR

La porzione ITS2 della regione genomica nucleare ITS (Internal Transcribed Spacer) è stata amplificata utilizzando i primer 3S forward 5'-GGTACCGGTGGATCACTCGGCTCGTG-3' e BD2 reverse 5'-TATGCTTAAATTCAGCGGGT-3' per ITS2 (Bowles et al., 1993).

Tutte le PCR sono state allestite in un volume finale di 25 µl, utilizzando il kit di amplificazione PuRe Taq™ Ready-to-go™ PCR beads GE Healthcare (Regno Unito). La reazione di PCR è stata preparata aggiungendo 18 µl d'acqua mq sterile, 2 µl di di ciascun primer 10 µM, e 3 µl di DNA (5 ng/µl). Un controllo

negativo ed uno positivo sono stati inclusi in tutte le reazioni di amplificazione, usando il termociclatore Perkin-Elmer Gene Amp PCR System 9700.

I regimi di temperature utilizzati sono i seguenti: per l'amplificazione di ITS2, denaturazione iniziale di 5 min a 95° C seguiti da 35 cicli di denaturazione a 94° C per 1 min, annealing a 50° C per 1 min, 72° C per 2 min, seguiti da una estensione finale a 72° C per 5 min.

Cinque µl dei prodotti di amplificazione sono stati visualizzati e fotografati agli UV (Uvisave Sistem) dopo corsa elettroforetica in gel di agarosio all' 1% in TAE 1x, per 30 min a 4 Volt/cm V e successiva colorazione con Bromuro di Etidio (0,24 µg/ml).

Sequenziamento

Il prodotto della PCR è stato purificato utilizzando il kit commerciale NucleoSpin Extract (Macherey-Nagel, Duren, Germania) seguendo le istruzioni della casa produttrice. Il sequenziamento è stato in parte eseguito tramite il servizio esterno dalla MWG-BIOTECH AG (Ebersberg, Germania), e in parte presso i laboratori dell'Istituto di Parassitologia Biology Centre of the Academy of Sciences della Repubblica Ceca mediante ABI BigDye chemistry (ABI Perkin-Elmer).

Le sequenze sono state aggiustate e assemblate utilizzando il software MEGA 5 (Tamura et al., 2011) e allineate con il programma ClustalW e realizzate con il software MEGA 5.

L'analisi di maximum likelihood è stata effettuata utilizzando il programma MEGA 5. È stato impostato un modello evolutivo six-rates custom che consente di stimare le proporzioni dei siti invariabili e la distribuzione di gamma. È stato utilizzato l'algoritmo SPR (subtree pruning and regrafting) con 1.000 repliche di bootstrap.

Le relazioni genetiche tra individui sono state valutate con il programma MEGA 5 utilizzando l'algoritmo neighbourjoining (NJ), ed escludendo dall'analisi le inserzioni/delezioni (indels) di probabile scarso valore filogenetico (Redd e

Stoneking, 1999). Le relazioni evoluzionistiche sono state calcolate con il modello a due parametri di Kimura, con un bootstrap di 1.000 repliche. Sia per l'albero ML che per quello NJ i nodi con percentuale di bootstrap <70% sono stati considerati non supportati statisticamente (Hills e Bull, 1993).

Analisi statistica

Per ogni esemplare di muggine esaminato è stato valutato il numero di ognuno dei quattro tipi di metacercarie presenti, standardizzata per 100 g di muscolo. Sono stati quindi calcolati gli indici epidemiologici di Bush et al. (1997):

- Prevalenza, numero di individui di una specie ospite infestati da una specie parassitaria ÷ numero totale degli esemplari della specie ospite esaminati.
- Intensità di infestazione, numero di individui di una specie parassitaria in ogni individuo ospite (standardizzata a 100 g).
- Intensità di infestazione media, numero totale degli individui di una determinata specie parassitaria in un campione ÷ numero degli individui ospiti infestati da quella specie nell'interno del campione (standardizzata a 100 g).

Le elaborazioni statistiche sono state effettuate esclusivamente sui campioni di Mistras, mediante foglio di calcolo e con il programma Quantitative Parasitology 3.0 (Reiczigel e Rózsa, 2005). In particolare, le differenze della prevalenza e dell'intensità media sono state valutate con il test esatto di Fisher e il bootstrap test, rispettivamente.

RISULTATI

Dei 71 esemplari di muggini provenienti dalle diverse località, 61 (86%) sono risultati infestati da metacercarie nel muscolo, nei quali sono state complessivamente repertate 17.899 metacercarie. In particolare, dei 60 ospiti provenienti dallo Stagno di Mistras, 57 (98%) sono risultati positivi (12 *C. labrosus*, 92%; 16 *L. aurata*, 89%; 6 *L. ramada*, 100%; 8 *L. saliens*, 100%; 15 *M. cephalus*, 100%). Relativamente ai muggini prelavati presso altre località, 4 (36%) degli 11 esemplari esaminati sono risultati infestati da metacercarie a livello muscolare (2 nello Stagno di Calich, e 2 in quello di Marceddi).

Sulla base delle caratteristiche morfologiche (forma, dimensioni, strutture interne osservabili allo stereomicroscopio, Figura 4.11), le metacercarie sono state suddivise in quattro tipi: sferiche (14.113), ellissoidali grandi (1.606), ellissoidali piccole (1.225) e spinose (955). Oltre la metà delle metacercarie sono state repertate in *M. cephalus* dello stagno di Mistras (9.646), delle quali la maggior parte appartenenti al gruppo delle sferiche (8.097).

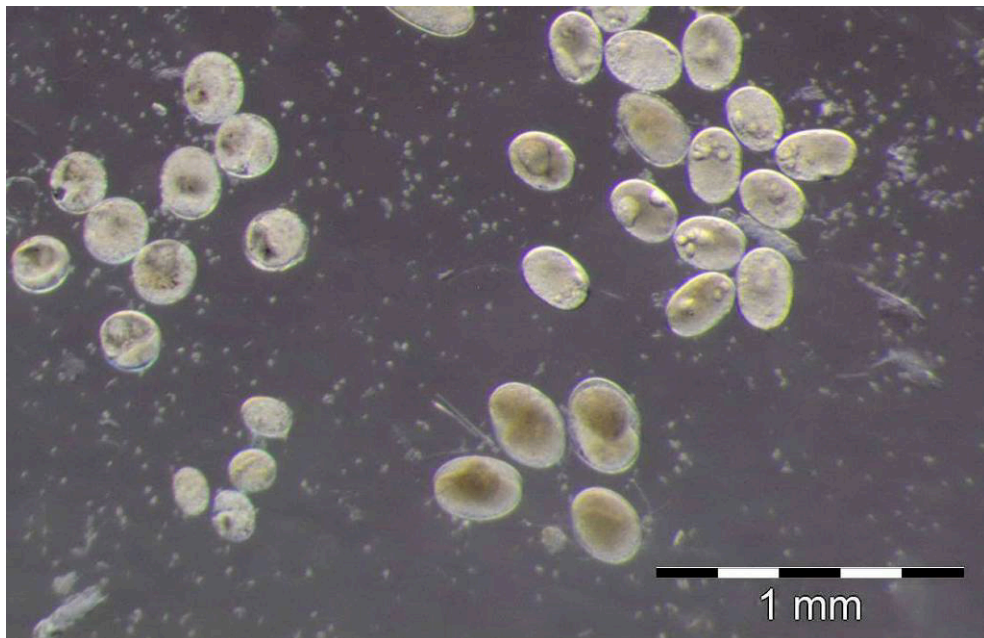


Figura 4.11. Metacercarie raggruppate per tipi morfologici.

Descrizione dei gruppi morfologici di metacercarie

Vengono di seguito descritte le principali caratteristiche morfometriche dei quattro gruppi di metacercarie; le medie delle misurazioni sono seguite dal range di variazione.

I gruppi delle metacercarie sferiche e spinose possono essere considerati gruppi omogenei e ben caratterizzati morfologicamente. Questi corrispondono, rispettivamente, alle descrizioni di metacercarie di interesse zoonotico di *Heterophyes* sp. e *Phagicola (Ascocotyle)* sp. descritte da Witenberg (1928), Scholz (1997), Pearson (2008) e Portes Santos (2013). Nei due gruppi di metacercarie ellissoidali (grandi e piccole) sono state incluse le metacercarie non immediatamente ascrivibili ad uno dei due generi succitati. Pertanto, questi gruppi sono più eterogenei, e ad essi potrebbero essere ascrivibili più generi.

Metacercarie sferiche (Figura 4.12)

Metacercarie (Figura 4.12.A) di forma approssimativamente sferica, che misurano 241 μm (174-356 μm) x 213 μm (165-349 μm), con parete spessa 3 μm (1-5 μm) ben evidente. La larva al suo interno è ripiegata su se stessa e nei preparati a fresco è in continuo movimento. Una volta excistata (Figura 4.12.C), ha corpo ovalare lungo 52 μm (332-936 μm) e largo 162 μm (85-224 μm), provvisto di tegumento ricoperto da cuticola spinosa nei suoi tre quarti anteriori, e disseminato di pigmentazioni brunastre. La ventosa orale (Figura 4.12.B) è lunga 55 μm (37-78 μm) e larga 60 μm (42-79 μm) ed è priva di spine circumorali e di appendice posteriore. Il prefaringe, relativamente corto, misura 48 μm (24-77 μm) ed è seguito da un faringe sempre ben evidente e di forma ovalare, lungo 35 μm (27-45 μm) e largo 31 μm (17-46 μm). L'esofago misura 114 μm (39-175 μm), ad esso segue la biforcazione dei ciechi intestinali, che sono lunghi quasi quanto l'esofago e si prolungano fino alla vescica escrettrice. La ventosa ventrale (Figura 4.12.D), tondeggiante con un diametro di 58 μm (31-78 μm), è situata tra

terzo medio e terzo posteriore del corpo. La ventosa genitale (Figura 4.12.E) si trova sul lato sinistro della metà posteriore della ventosa ventrale, della quale è un pò più piccola $46 \mu\text{m}$ (20-65 μm) x $41 \mu\text{m}$ (19-65 μm). Lungo il margine interno sono più o meno evidenti degli scleriti (rodlets) disposti a ferro di cavallo. Nel terzo posteriore del corpo si trova la vescica escrettrice, che ha forma di Y.

Questo gruppo, in base alle descrizioni di Witenberg (1928) e Pearson (2008), è ascrivibile al genere *Heterophyes*.

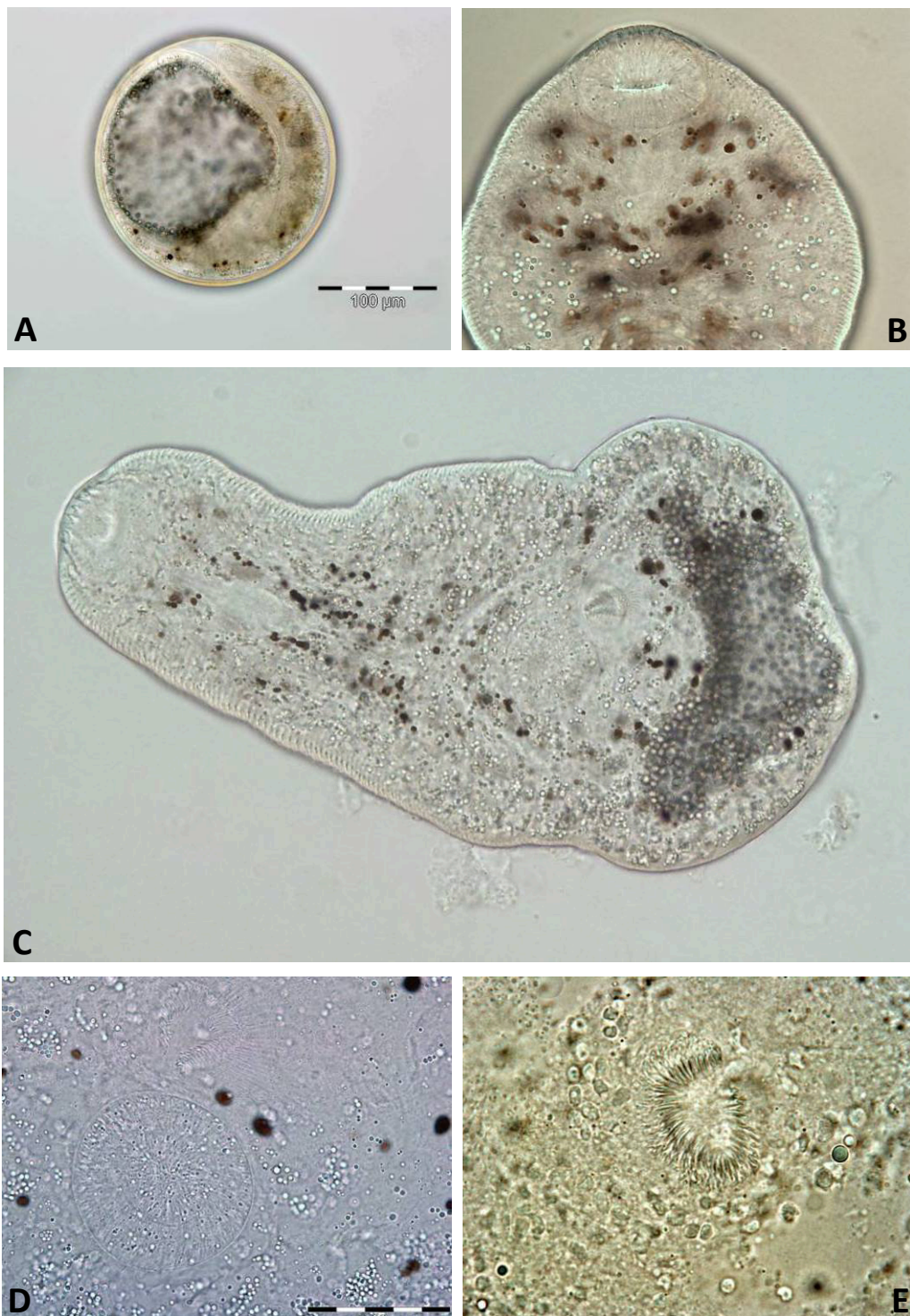


Figura 4.12. Metacercaria sferica. Metacercaria in toto (A). Ventosa orale (B). Larva excistata (C). Ventosa ventrale (D). Ventosa genitale (E).

Metacercarie ellissoidali grandi (Figura 4.13)

Gruppo eterogeneo di metacercarie di forma ovalare (Figura 4.13.A), lunghe 429 μm (306-453 μm) e larghe 380 μm (246-388 μm), con parete spessa 3 μm (2-5 μm). All'interno la larva è avvolta su se stessa, ed è possibile distinguere poche strutture, tra le quali la ventosa orale e il prefaringe. Il corpo (Figura 4.13.C) misura 863 μm (788-926 μm) x 165 μm (131-190 μm) è piriforme, e nei preparati a fresco la larva è vitale e si allunga assumendo forma di lingua. La ventosa orale (Figura 4.13.B) tondeggiante, priva di spine circumorali, è lunga 73 μm (65-78 μm) e larga 63 μm (50-71 μm). Il prefaringe, lungo 98 μm (90-105 μm) si continua nel faringe, che ha forma ovalare, è lungo 39 μm (35-43 μm) e largo 40 μm (28-52 μm). La ventosa ventrale non è stata osservata. In numerosi esemplari è stato messo in evidenza un sacco ventrogenitale (Figura 4.13.D), di forma ovalare, lungo 50 μm (39-62 μm) e largo 33 μm (31-46 μm), con all'interno un gonotile che, quando estroflesso, protrude mostrando una corona di spine (Figura 4.13.E). La vescica escrettrice non è sempre visibile.

Questo gruppo non è stato ascritto a nessun taxon, le metacercarie con sacco ventrogenitale, come più sopra descritto, sono morfologicamente affini al genere *Stictodora*.

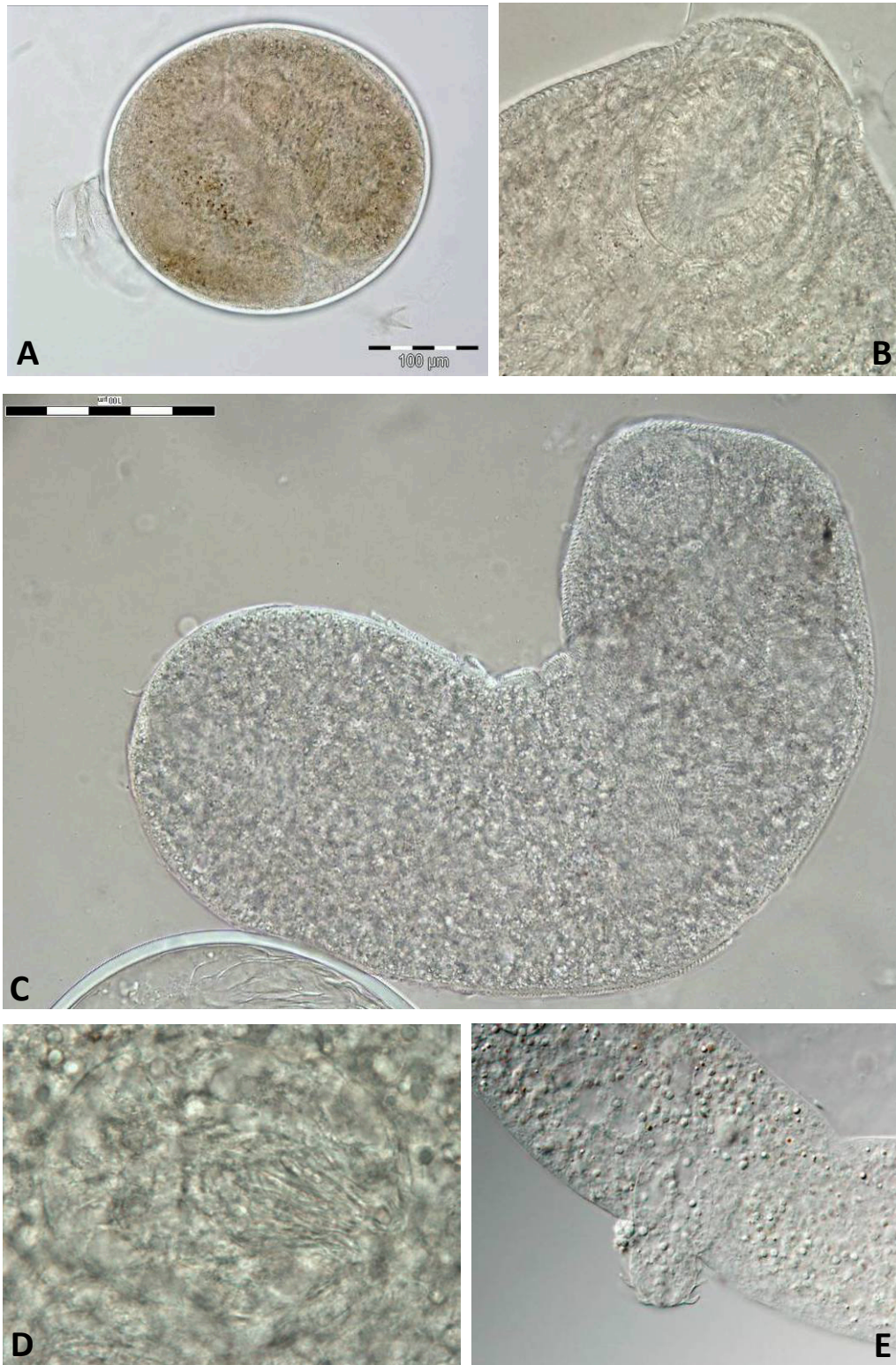


Figura 4.13. Metacercaria ellissoidale grande. Metacercaria in toto (A). Ventosa orale (B). Larva excistata (C). Sacco ventrogenitale (D). Gonotile estroflesso (E).

Metacercarie ellissoidali piccole (Figura 4.14)

Metacercarie di forma ovale (Figura 4.14.A), e di dimensioni inferiori alle altre, lunghe 184 μm (155-252 μm) e larghe 176 μm (131-211 μm) con parete ben evidente, spessa 2 μm (1-3 μm). Il corpo (Figura 4.14.C) è piriforme, lungo 257 μm (217-354 μm) e largo 87 μm (73-115 μm); presenta una cuticola spinosa nei $\frac{3}{4}$ anteriori, ed è disseminato di pigmenti brunastri. La ventosa (Figura 4.14.B) orale è grande, arrotondata e priva di spine circumorali, lunga 43 μm (25-67 μm) e larga 42 μm (36-67 μm). Il prefaringe è lungo 37 μm (15-64 μm), il faringe ha forma ovalare, lungo 30 μm (25-36 μm) e largo 26 μm (13-42 μm). L'esofago è lungo 20 μm (16-24 μm), ed è seguito dalla biforcazione dei due ciechi intestinali, che si estendono posteriormente a livello della ventosa ventrale. Quest'ultima (Figura 4.14.D) è ben sviluppata, tondeggiate, e misura 41 μm (27-42 μm) x 37 μm (33-43 μm). È spesso osservabile una ventosa genitale (Figura 4.14.E) tondeggiate e di dimensioni ridotte (diametro 14 μm , 12-17 μm), situata sul lato sinistro della metà posteriore della ventosa ventrale. La vescica escrettrice è spesso ben evidente, ed ha forma di V o Y.

Questo gruppo non è stato ascritto a nessun taxon, le metacercarie con ventosa genitale osservabile come più sopra descritto hanno affinità morfologica con quelle del genere *Heterophyes*.

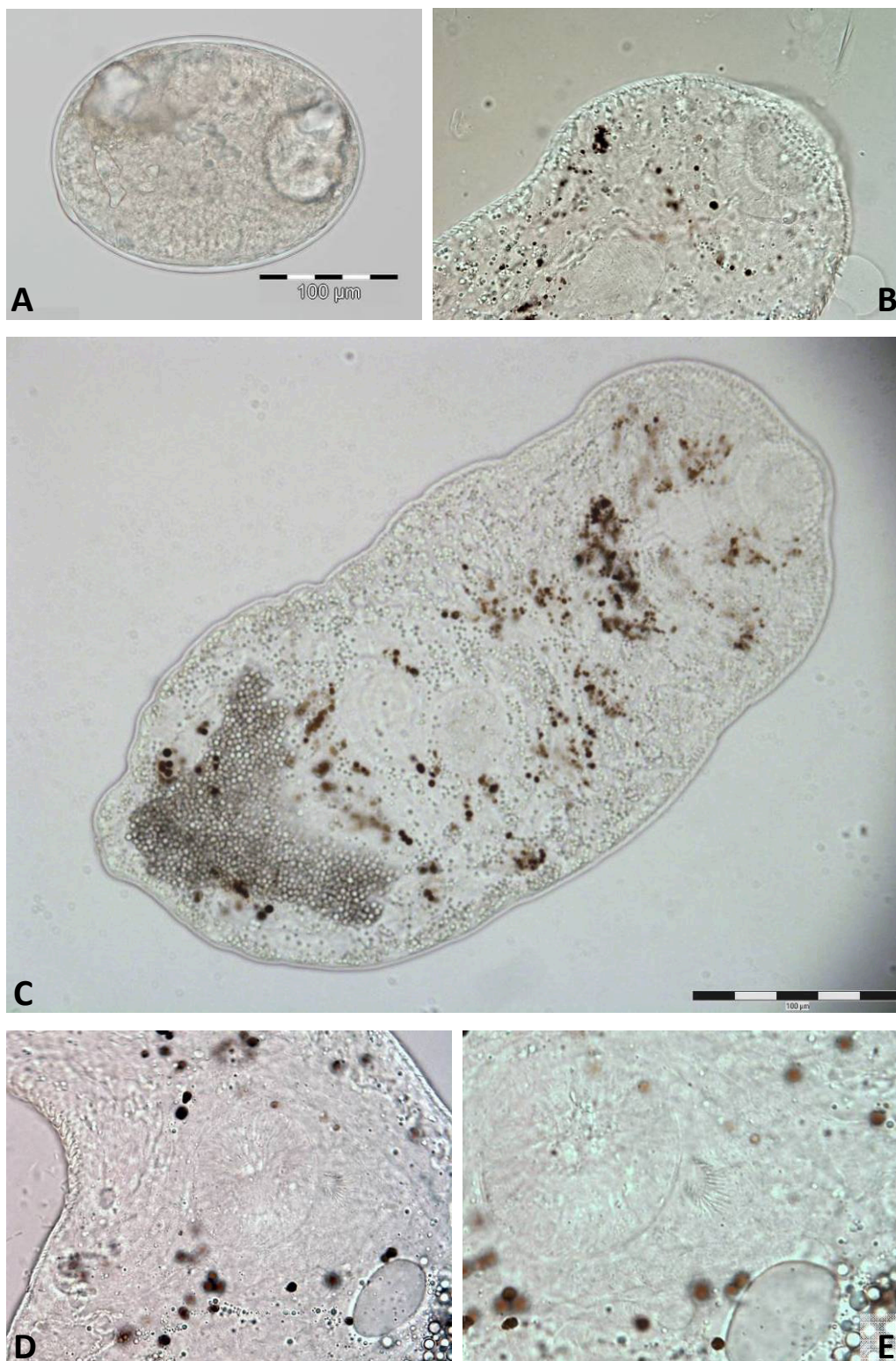


Figura 4.14. Metacercaria ellissoidale piccola. Metacercaria in toto (A). Ventosa orale, prefaringe e faringe (B). Larva excistata (C). Ventosa ventrale (D). Ventosa genitale (E).

Metacercarie spinose (Figura 4.15)

Metacercaria di forma ovalare (Figura 4.15.A), di 269 μm (265-336 μm) x 221 μm (194-277 μm), con parete spessa e ben evidente di 5 μm (3-6 μm). La larva al suo interno (Figura 4.15.C) ha corpo piriforme, lungo 644 μm (528-762 μm) e largo 124 μm (64-159 μm), con tegumento ricoperto quasi interamente da spine; talvolta sono presenti pigmenti brunastri concentrati nella metà anteriore del corpo. La ventosa orale (Figura 4.15.B) ha forma di calice, con diametro 42 μm (39-47 μm), provvista di un'unica fila di 18-20 spine circumorali, lunghe 14 μm (13-15 μm). Il prefaringe (Figura 4.15.D) è lungo 179 μm (139-191 μm), ed il faringe è lungo 35 μm (30-49 μm) e largo 31 μm (26-38 μm). L'esofago misura 94 μm (65-164 μm), e si continua con i ciechi intestinali che raggiungono il livello dei testicoli. La ventosa ventrale (Figura 4.15.E), tondeggiante, misura 39 μm (34-46 μm) x 40 μm (35-51 μm). La ventosa genitale è assente. La vescica escrettrice, non sempre osservabile, ha forma di Y/O/X e maschera parzialmente i primordi degli organi genitali.

Sulla base delle descrizioni di Sholz (1997) e Portes Santos (2013), questo gruppo è ascrivibile al genere *Ascocotyle* (*Phagicola*).

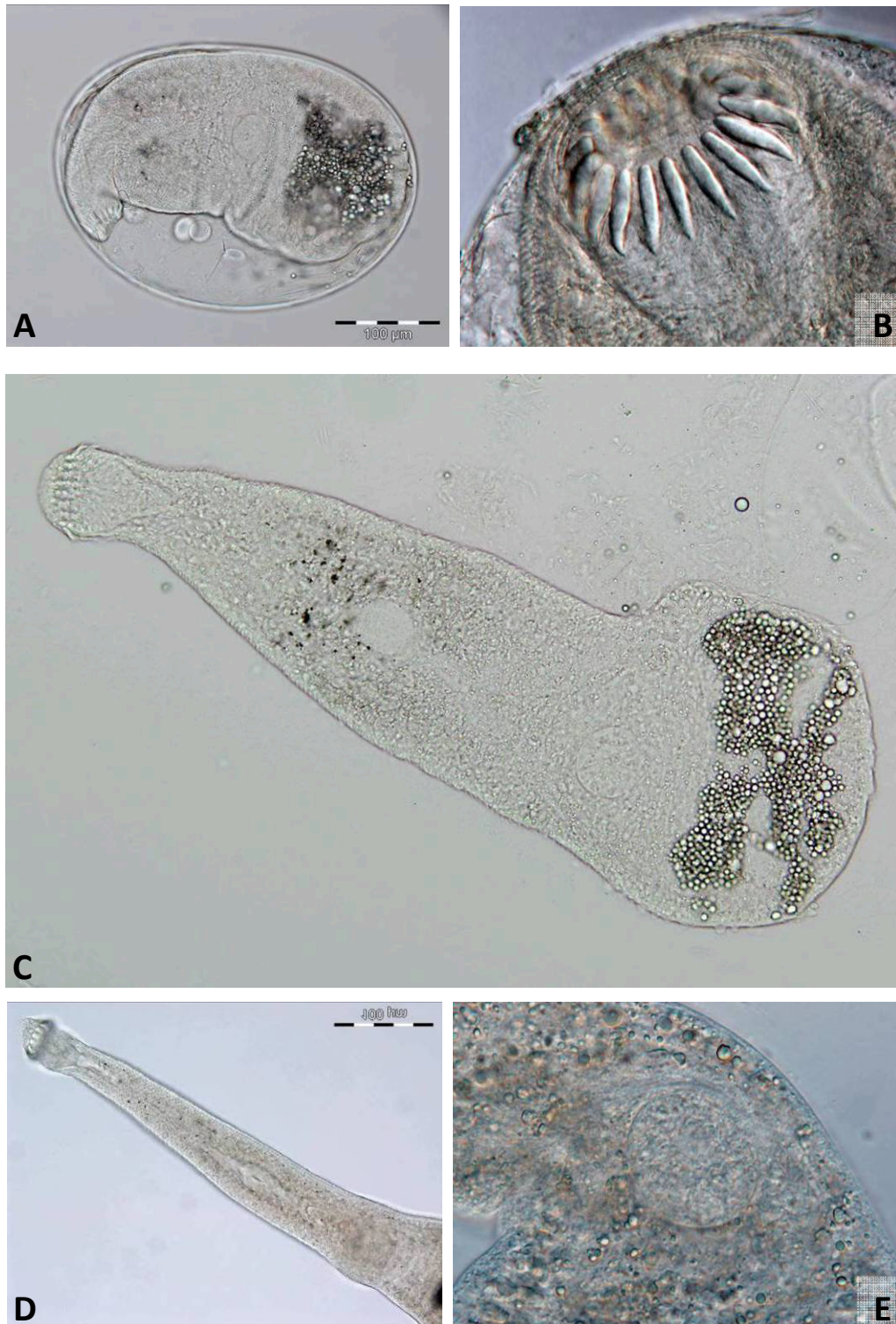


Figura 4.15. *Metacercaria spinosa*. Metacercaria in toto (A). Ventosa orale e spine circumorali (B). Larva excistata (C). Ventosa orale, prefaringe, faringe ed esofago (D). Ventosa ventrale (E).

Parassiti adulti (Figure 4.16-19)

Viene di seguito riportata la descrizione delle principali caratteristiche morfologiche degli otto individui adulti repertati in seguito all'infestazione sperimentale, dei quali quattro montati vivi in preparati temporanei e quattro colorati con carminio cloridrico (Figure 4.16-19, Tabella 4.II); le medie delle misurazioni sono seguite dal range di variazione.

Corpo piriforme (Figure 4.16-17.A) lungo 629 μm (457-816 μm) e largo 351 μm (210-575 μm), ricoperto di scaglie su tutta la superficie, tranne che a livello delle aperture della ventosa orale, della ventosa ventrale, della ventosa genitale e nella parte terminale del parassita. Lateralmente all'esofago sono presenti macchie pigmentate.

La ventosa orale (Figure 4.16-17.B) è sub-terminale, lunga 64 μm (54-99 μm) e larga 60 μm (50-85 μm); il prefaringe (Figure 4.16-17.C) è lungo 45 μm (32-74 μm). Il faringe (Figure 4.16-17.C) lungo 48 μm (39-57 μm) e largo 34 μm (24-50 μm) si continua nell'esofago, (Figura 4.16 B,C), che misura 61 μm (37-98 μm). La biforcazione intestinale (Figura 4.16.B,C) si trova a livello del terzo medio del corpo, anteriormente alla ventosa ventrale. I ciechi intestinali sono lunghi, con parete spessa e terminano posteriormente ai testicoli (Figura 4.16 D).

La ventosa ventrale (Figure 4.16.B-17.D) si localizza circa a metà del corpo, subito dietro la biforcazione intestinale, è lunga 126 μm (100-192 μm) e larga 112 μm (92-168 μm). La ventosa genitale (Figure 4.16.B,E-17.D,20,21), con apertura rivolta verso la ventosa ventrale, è situata posteriormente e a sinistra rispetto alla ventosa ventrale, ed è lunga 118 μm (92-168 μm) e larga 99 μm (71-126 μm). Il gonotile è armato di scleriti a forma di pettine (rodlets) (Figure 4.16.E-17.D,20,21), disposti in circolo, in numero variabile da 60 a 74. Ciascuno sclerite presenta 4-6 spine.

I testicoli (Figura 4.16.D) sono obliqui, ovali, situati postero-lateralmente. Il testicolo destro è lungo 108 μm (63-153 μm) e largo 66 μm (46-89 μm) ed è situato leggermente indietro rispetto al sinistro, che è lungo 107 μm (79-142 μm) e largo 67 μm (40-98 μm).

L'ovario (Figura 4.16.D) è mediano, ventrale, lungo 85 μm (55-127 μm) e largo 57 μm (35-81 μm). I vitellogeni sono disposti in due gruppi, uno per ciascuno lato e sono distribuiti grossomodo dall'altezza dell'ovario sino al livello dei testicoli. Le uova sono lunghe 24 μm (23-25 μm) e larghe 14 μm (12-15 μm).

Il poro escretore (Figura 4.16.D) è situato postero-ventralmente, e si apre nella vescica a forma di Y, che si biforca posteriormente all'ovario e anteriormente ai testicoli.

Sulla base delle descrizioni di Ransom (1920), Witenberg (1928), Waikagul e Pearson (1989), Chai e Lee (1990), Kino et al. (2002), e in particolare in funzione al numero degli scleriti presenti a livello del gonotile, sei adulti sono stati identificati come *Heterophyes heterophyes*, con 71-74 scleriti nel gonotile (Figure 4.16,18,20; Tabella 4.II, individui Ad-B-F, H), e due come la specie asiatica *Heterophyes* cf. *nocens*, con 60-62 scleriti nel gonotile (Figure 4.17,19,21; Tabella 4.II, individui Ad-A,G).

Tabella 4.II. Principali caratteri morfologici degli individui adulti di *Heterophyes heterophyes* (Ad-B-F,H), e *Heterophyes cf. nocens* (Ad-A,G) ottenuti mediante infestazione sperimentale. Le misurazioni sono espresse in μm . L, lunghezza; LA, larghezza; VENT, ventosa.

Individuo Carattere	Ad-A	Ad-B	Ad-C	Ad-D	Ad-E	Ad-F	Ad-G	Ad-H
L TOTALE	816	746	726	608	645	457	487	548
LA TOTALE	575	403	410	360	210	251	287	313
L VENT. ORALE	99	80	81	70	59	58	54	68
LA VENT. ORALE	85	75	56	55	53	53	52	50
PREFARINGE		74			30		32	
L FARINGE	57	54	54		44	43	39	47
LA FARINGE	40	50	44		25	24	26	26
ESOFAGO	83	63			98	37	37	49
L VENT	192	133	137	132	101	100	102	118
LA VENT	168	112	119	108	96	92	101	97
L VENT GENITALE	168	154	109	129	92	103	100	94
LA VENT	126	125	97	95	111	87	81	71
L OVARIO	127	102	103	108	62	65	61	55
LA OVARIO	71	81	73	63	43	44	50	35
L TESTICOLO DX	153	130	139	131	81	79	95	63
LA TESTICOLO DX	78	84	89	76	46	47	71	40
L TESTICOLO SN	142	135	127	130	79	83	91	67
LA TESTICOLO SN	81	77	98	85	40	48	57	48
LxLA UOVA	25x1	24x1	25x1	25x1	25x1	23x1	23x1	24x1
NUMERO	60	72	74	72	74	71	62	73

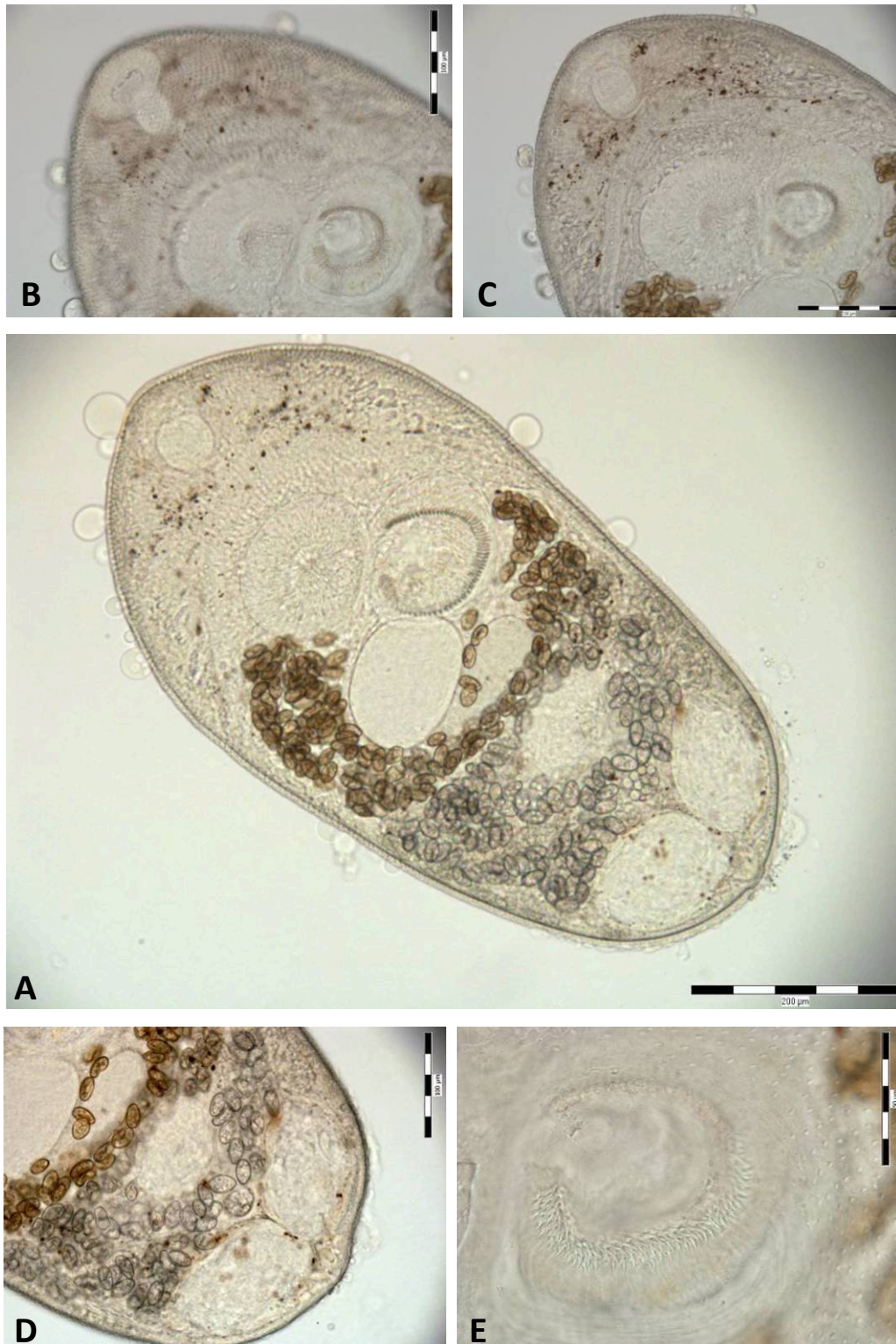


Figura 4.16. *Heterophyes heterophyes*, adulto, individuo Ad-C. Esemplare in toto (A). Ventosa orale, ventosa ventrale e ventosa genitale (B). Faringe e biforcazione intestinale (C). Testicoli e ovario (D). Particolare della ventosa genitale (E).

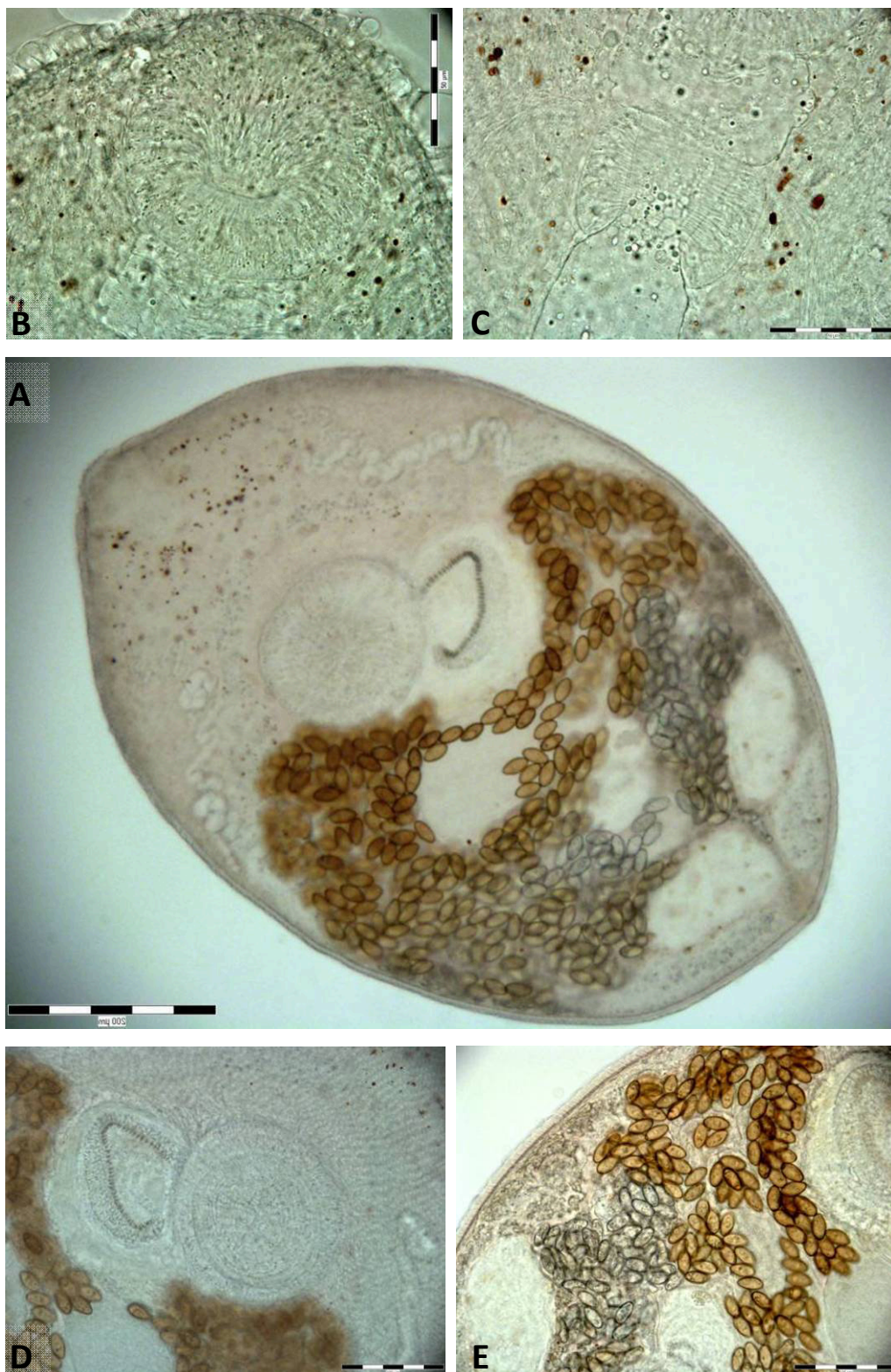


Figura 4.17. *Heterophyes* cf. *nocens*, adulto, individuo Ad-A. Esemplare in toto (A). Ventosa orale (B). Prefaringe e faringe (C). Ventosa ventrale e ventosa genitale (D). Uova e vitellogeni (E).

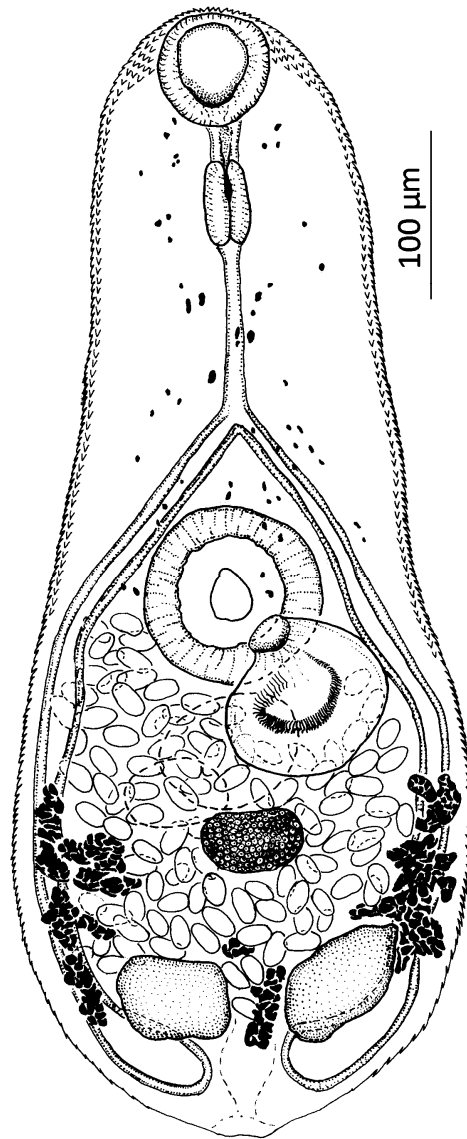


Figura 4.18. *Heterophyes heterophyes*, adulto, esemplare Ad-E. Disegno realizzato alla camera lucida.

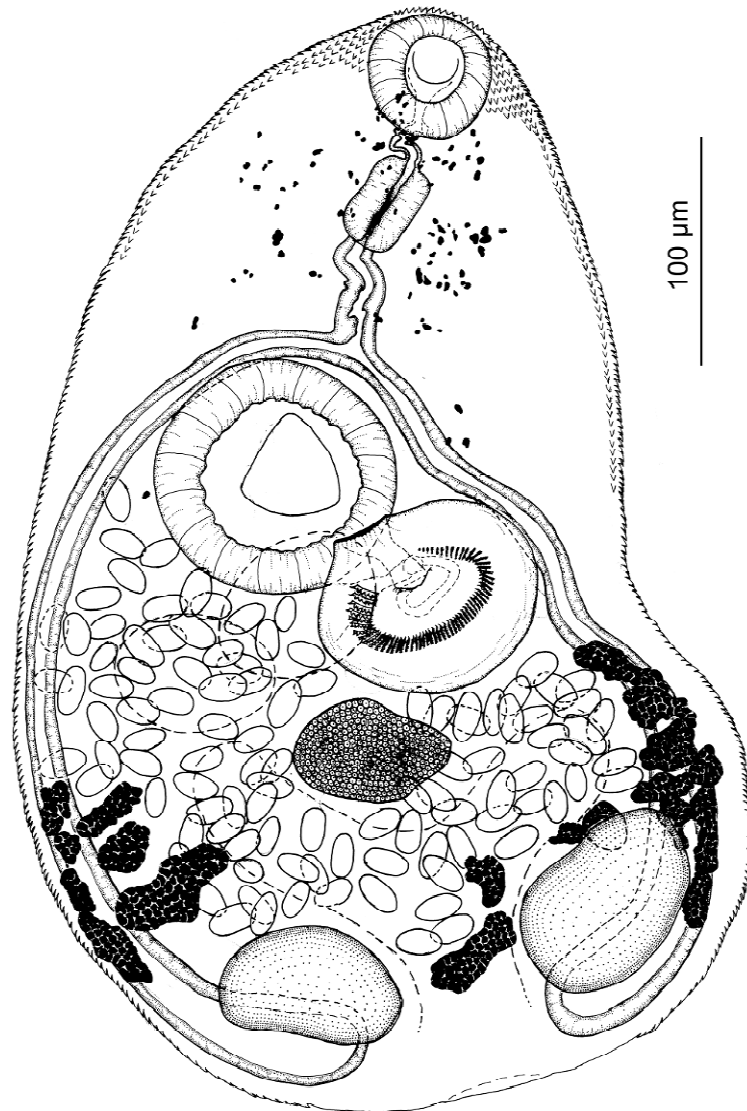


Figura 4.19. *Heterophyes cf. nocens*, adulto, esemplare Ad-G. Disegno realizzato alla camera lucida.

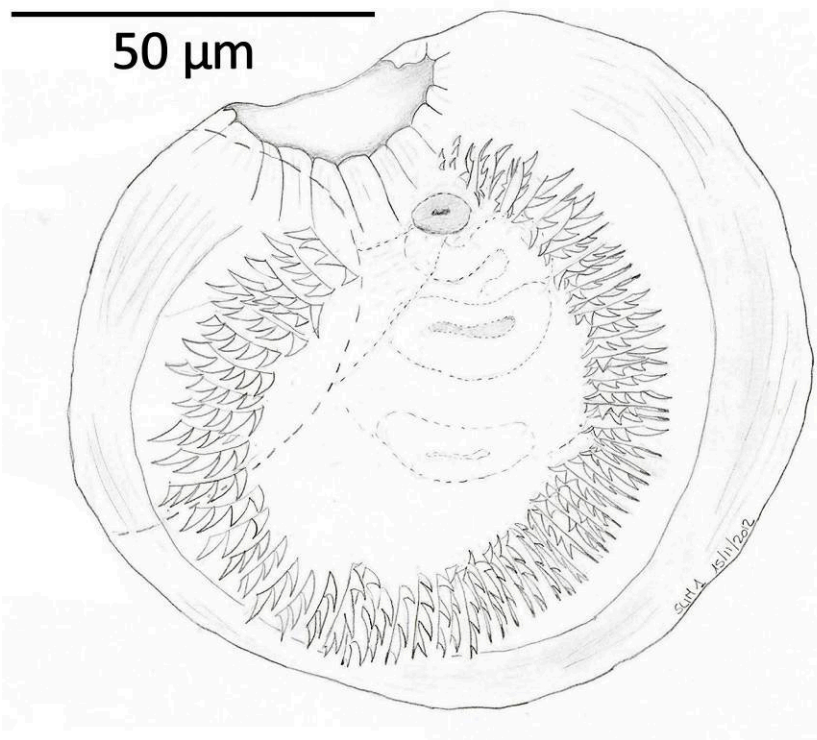


Figura 4.20. *Heterophyes heterophyes*, particolare della ventosa genitale dell'esemplare Ad-F. Disegno realizzato alla camera lucida.

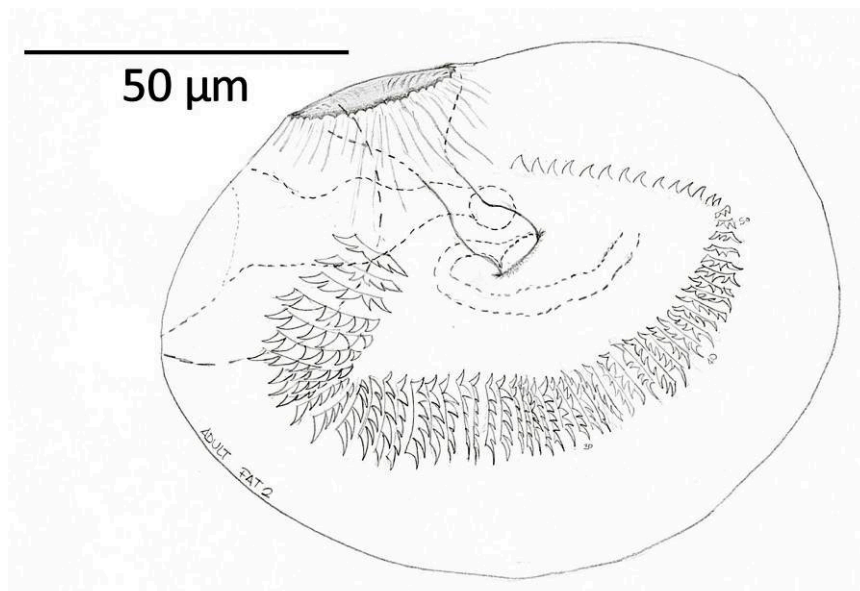


Figura 4.21. *Heterophyes cf. nocens*, particolare della ventosa genitale dell'esemplare Ad-G. Disegno realizzato alla camera lucida.

Analisi molecolare

PCR

Per l'analisi molecolare sono state esaminate 40 metacercarie dei quattro tipi morfologici repertate nella muscolatura degli ospiti dello Stagno di Mistras (Tabella 4.III), e 4 degli 8 individui adulti ottenuti dall'infestazione sperimentale con metacercarie di tipo sferico repertate in *Mugil cephalus* di Mistras (3 *H. heterophyes* e 1 *H. cf. nocens*). I parassiti sono stati analizzati mediante PCR, l'amplificazione della porzione ITS2 della regione genomica nucleare ITS del DNA ribosomiale (rDNA) con i primers 3S forward e BD2 reverse 5' ha prodotto un frammento di circa 450 bp (Figura 4.22).

Tabella 4.III. Numero di metacercarie esaminate mediante PCR (N PCR) e sottoposte a sequenziamento (N seq) per ciascun tipo morfologico e specie ospite.

Tipo Morfologico	Specie ospite	N PCR	N seq
Sferiche	<i>M. cephalus</i>	12	8
	<i>L. saliens</i>	4	3
	<i>L. ramada</i>	3	3
	<i>C. labrosus</i>	5	3
Ellissoidali Piccole	<i>C. labrosus</i>	2	1
	<i>L. ramada</i>	2	1
Ellissoidali Grandi	<i>L. saliens</i>	4	2
Spinose	<i>C. labrosus</i>	5	3
	<i>L. aurata</i>	3	2

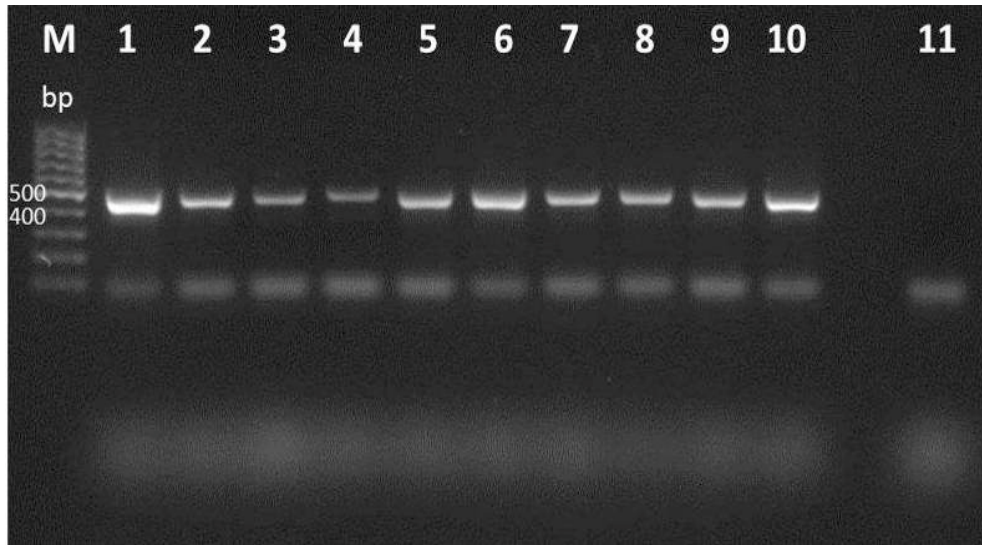


Figura 4.22. Corsa elettroforetica della PCR della porzione genomica nucleare ITS2. M, marker; 1, controllo positivo; 11, controllo negativo.

Sequenziamento

Il rDNA della porzione ITS2 isolato da 27 metacercarie (17 sferiche, 2 ellissoidali piccole, 2 ellissoidali grandi e 6 spinose) e dai 4 individui adulti è stato sequenziato ed esaminato. Utilizzando *Haplorchis taichui* come outgroup, l'analisi di maximum likelihood (ML) ha evidenziato quattro cluster principali (Figura 4.23) supportati da alti valori di bootstrap. Il cluster A raggruppa le metacercarie morfologicamente identificate come *sferiche* e gli adulti identificati morfologicamente come *H. heterophyes* ed *H. cf. nocens*, il cluster B con individui appartenenti al tipo morfologico *ellissoidali piccole*, il cluster C con il tipo morfologico *ellissoidali grandi*, e il D col morfotipo *spinose*. L'analisi di neighbourjoining (NJ) è coerente con quella di ML, e mostra la stessa topologia dell'albero e gli stessi nodi altamente supportati per i quattro gruppi individuati (per i valori di bootstrap vedere la Figura 4.23).

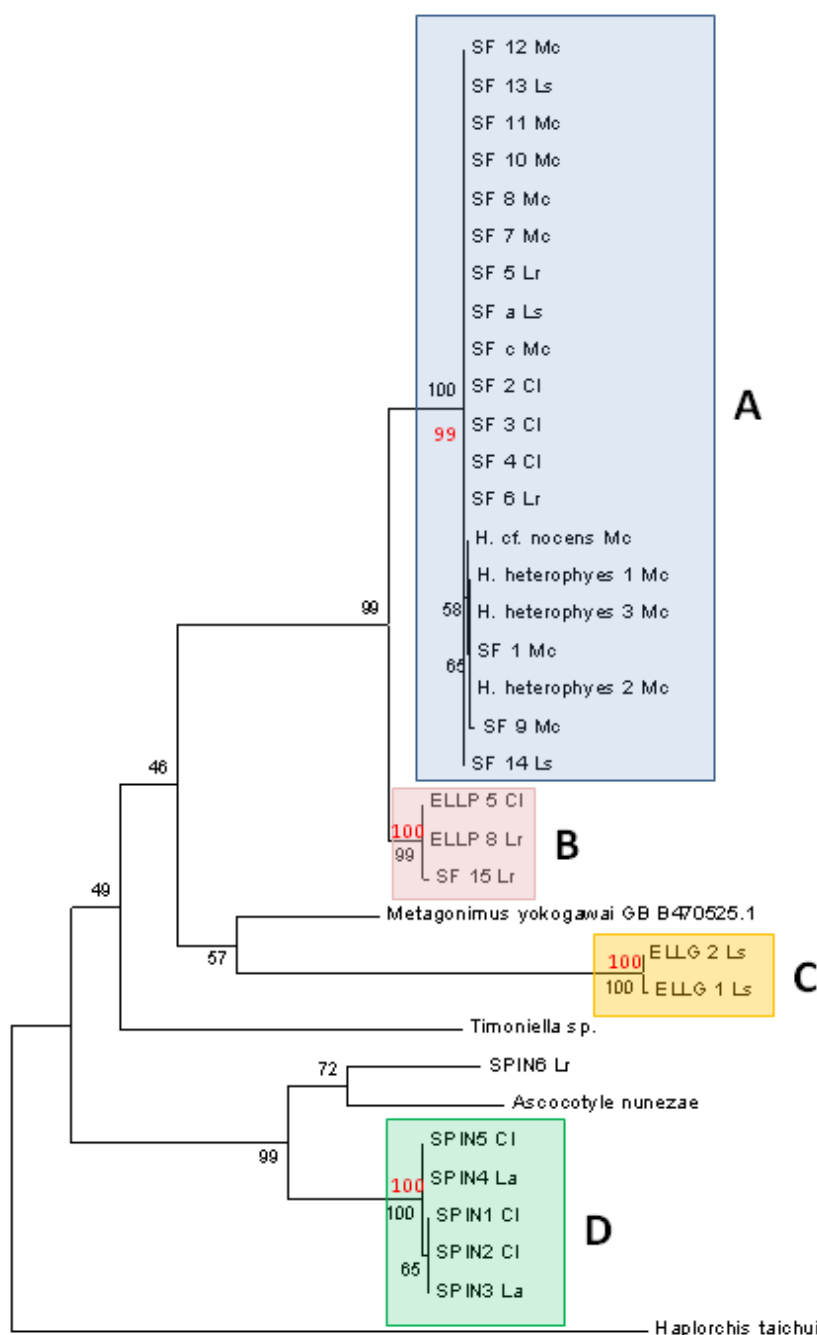


Figura 4.23. Albero ML, la radice è rappresentata dall'outgroup *Haplorchis taichui*. Il supporto dei cluster principali (espresso come valore di bootstrap) è in nero. I valori di bootstrap ottenuti per l'analisi NJ sono indicati in rosso. SF: tipo morfologico sferico; ELLP: tipo morfologico *ellissoidali piccole*; ELLG: tipo morfologico *ellissoidali grandi*; SPIN: tipo morfologico *spinose*; Mc: *Mugil cephalus*; Ls: *Liza saliens*; Lr: *Liza ramada*; Cl: *Chelon labrosus*; La: *Liza aurata*.

Analisi statistica

I livelli di infestazione dei quattro gruppi morfologici di metacercarie nelle diverse specie di muggini e per località, sono riportati nella tabella 4.IV, ed i valori relativi allo Stagno di Mistras sono rappresentati graficamente nella figura 4.24.

Confrontando le infestazioni degli ospiti dello Stagno di Mistras rispetto a quelle degli ospiti degli Stagni di Calich e Marceddì, si osserva una limitata ricchezza e abbondanza di metacercarie negli ultimi due ambienti. Infatti, mentre a Mistras sono state campionate le cinque specie di muggine e repertati i quattro morfotipi di metacercarie in ogni specie ospite, nel Calich ed a Marceddì è stato identificato solo il morfotipo di metacercarie spinose in *L. ramada*, e con livelli di infestazione nettamente inferiori rispetto a Mistras.

Generalmente i livelli d'infestazione di metacercarie nei muggini di Mistras sono risultati elevati, spesso con valori di prevalenza prossimi al 100%, in particolare il morfotipo sferico, soprattutto in *M. cephalus*, e con minimi quasi mai inferiori a 33%. Anche l'intensità media è elevata, con valori più alti nelle metacercarie sferiche in *M. cephalus*, ove raggiunge 841 metacercarie/100 g (mtc/100 g) di intensità media, e 2.174 mtc/100 g di massima.

Nelle tabelle 4.V e 4.VI sono riportati i confronti quantitativi tra i livelli di infestazione dei quattro tipi di metacercarie repertate nelle cinque specie di muggini dello Stagno di Mistras.

Confrontando i livelli di infestazione di ogni tipo di metacercaria tra i diversi ospiti (Tabella 4.V), l'intensità media del morfotipo sferiche è significativamente più elevata in *M. cephalus* che nelle altre specie (tranne *L. ramada*), e l'intensità media in *L. saliens* è superiore che in *L. aurata*.

Relativamente al morfotipo ellissoidali grandi, nessun confronto tra le specie ospite ha dato risultati significativi, mentre l'intensità media delle ellissoidali piccole è significativamente maggiore in *M. cephalus* che in qualunque altro ospite, e rispetto a *L. aurata* anche la prevalenza è significativamente superiore in *M. cephalus*.

Infine, il morfotipo spinose ha intensità significativamente più elevata in *L. aurata* che in *M. cephalus*.

Confrontando i diversi tipi di metacercarie dentro lo stesso ospite (Tabella 4.VI), in *C. labrosus* il tipo ellissoidali piccole ha la prevalenza significativamente più bassa di tutti gli altri.

Anche in *L. aurata* il tipo ellissoidali piccole ha prevalenza significativamente più bassa di tutti gli altri, e intensità media significativamente inferiore rispetto a sferiche e spinose. Inoltre, le sferiche hanno intensità media significativamente superiore rispetto alle ellissoidali grandi.

In *L. ramada* nessun test ha dato esito significativo, anche in ragione della dimensione del campione, mentre in *L. saliens* il tipo sferico è il più importante, ed ha prevalenza ed intensità media significativamente superiori rispetto alle ellissoidali piccole, e intensità media significativamente maggiore rispetto alle spinose.

In *M. cephalus* le sferiche sono il gruppo significativamente più importante rispetto a tutti gli altri, sia in termini di prevalenza che intensità media, e le ellissoidali piccole hanno intensità media significativamente superiore rispetto a ellissoidali grandi e spinose.

Tabella 4.IV. Livelli di infestazione dei quattro tipi di metacercarie nelle diverse specie di muggini esaminate per ogni località. P%, prevalenza; Im, intensità media; Int I, intervallo intensità. L'intensità è espressa in metacercarie/100 g di muscolo.

	Sferiche			Gr. Ellissoidali			Pic. Ellissoidali			Spinose		
	P%	Im	Int I	P%	Im	Int I	P%	Im	Int I	P%	Im	Int I
Mistras												
<i>C. labrosus</i>	92%	154	16 - 619	85%	39	3 - 103	15%	26	19 - 33	62%	150	4 - 938
<i>L. aurata</i>	78%	135	11 - 382	67%	35	6 - 233	11%	16	15 - 17	61%	99	4 - 427
<i>L. ramada</i>	100%	489	71 - 1500	67%	32	8 - 70	33%	36	20 - 52	83%	31	3 - 82
<i>L. saliens</i>	100%	329	63 - 660	50%	176	23 - 368	25%	40	15 - 64	75%	63	7 - 185
<i>M. cephalus</i>	100%	841	39 - 2174	67%	85	4 - 374	47%	336	38 - 671	53%	8	2 - 22
Calich												
<i>L. aurata</i>	0%	-	-	0%	-	-	0%	-	-	0%	-	-
<i>L. ramada</i>	0%	-	-	0%	-	-	0%	-	-	33%	3	2 - 5
Marceddi												
<i>L. ramada</i>	0%	-	-	0%	-	-	0%	-	-	50%	7	1 - 13

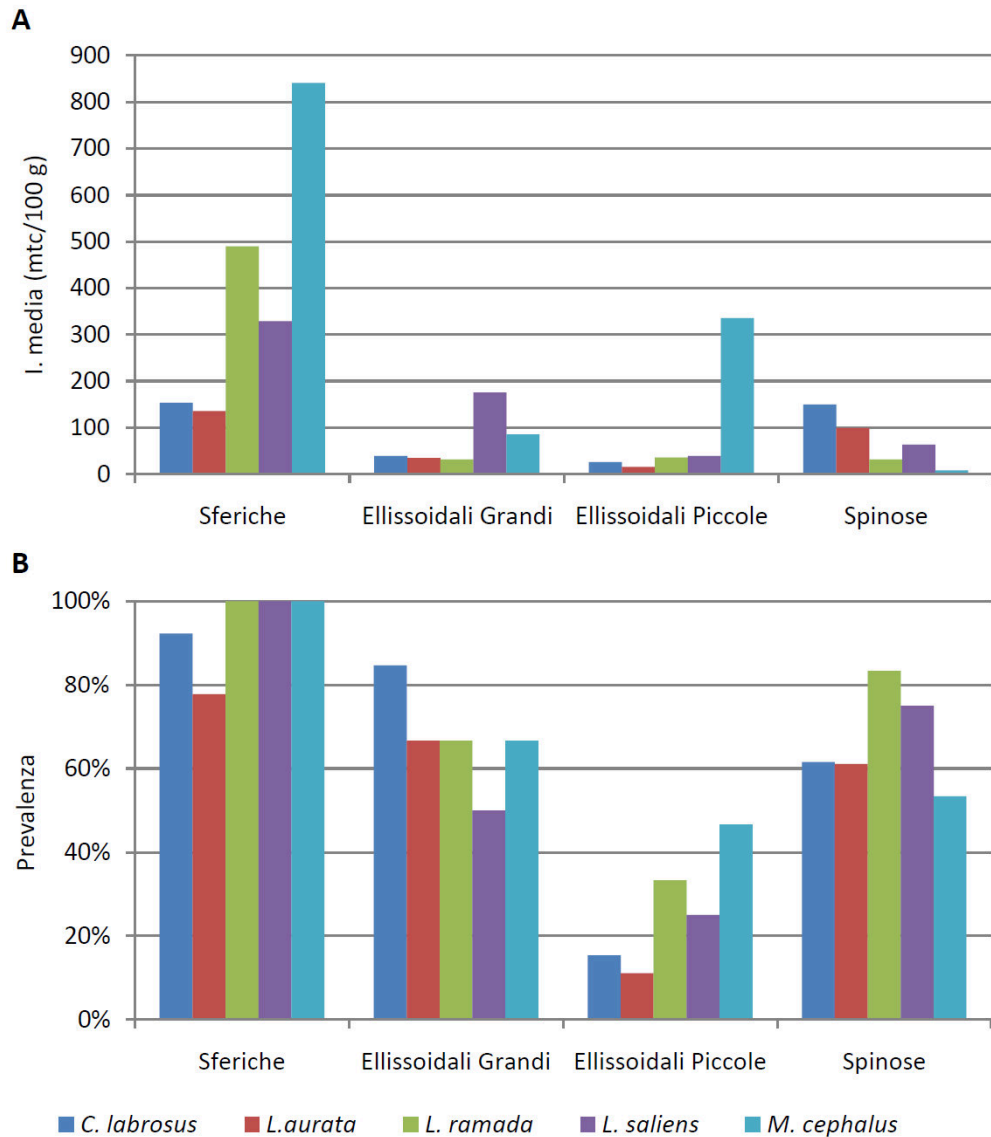


Figura 4.24. Livelli di infestazione dei quattro tipi di metacercarie nelle cinque specie di muggine nello Stagno di Mistras. Intensità media (A) e prevalenza (B).

Tabella 4.V. Confronti quantitativi tra i livelli di infestazione dei tipi di metacercaria tra i diversi ospiti dello stagno di Mistras. Prevalenza con test esatto di Fisher (P%) e intensità media con bootstrap test (Im). Metacercarie sferiche (SF), ellissoidali grandi (EG), ellissoidali piccole (EP), spinose (SP); ospiti *Chelon labrosus* (Cl), *Liza aurata* (La), *Liza ramada* (Lr), *Liza saliens* (Ls), *Mugil cephalus* (Mc).

EG \ SF	Cl	La	Lr	Ls	Mc	SP \ EP	Cl	La	Lr	Ls	Mc
Cl	\	-	-	-	Im	Cl	\	-	-	-	Im
La	-	\	-	Im	Im	La	-	\	-	-	P%-Im
Lr	-	-	\	-	-	Lr	-	-	\	-	Im
Ls	-	-	-	\	Im	Ls	-	-	-	\	Im
Mc	-	-	-	-	\	Mc	-	Im	-	-	\

Tabella 4.VI. Confronti quantitativi tra i livelli di infestazione dei tipi di metacercarie in ogni ospite dello stagno di Mistras. Prevalenza con test esatto di Fisher (P%) e intensità media con bootstrap test (Im). Metacercarie sferiche (SF), ellissoidali grandi (EG), ellissoidali piccole (EP), spinose (SP); ospiti *Celon labrosus* (Cl), *Liza aurata* (La), *Liza ramada* (Lr), *Liza saliens* (Ls), *Mugil cephalus* (Mc).

La \ Cl	SF	EG	EP	SP	Ls \ Lr	SF	EG	EP	SP	Mc	SF	EG	EP	SP
SF	\	-	P%	-	SF	\	-	-	-	SF	\	P%-Im	P%-Im	P%-Im
EG	Im	\	P%	-	EG	-	\	-	-	EG		\	Im	-
EP	P%-Im	P%	\	P%	EP	P%-Im	-	\	-	EP			\	Im
SP	-	-	P%-Im	\	SP	Im	-	-	\	SP				\

DISCUSSIONE

La presente indagine rappresenta un contributo alla conoscenza sulla presenza e diffusione di metacercarie di eterofidi nel muscolo di muggini dello stagno di Mistras (Sardegna, Mediterraneo occidentale), e fornisce per la prima volta dati quantitativi sui livelli di infestazione nei pesci degli ambienti salmastri della Sardegna e dell'Italia.

È anche il primo contributo alla caratterizzazione molecolare della specie *H. heterophyes*, e fornisce per la prima volta informazioni sul marcatore molecolare ITS2 dei generi *Heterophyes* ed *Ascocotyle (Phagicola)*. Infatti, i dati molecolari delle specie dei generi *Heterophyes* ed *Ascocotyle (Phagicola)* presenti in letteratura e/o depositati su Genbank sono scarsi, e sono riferiti a *H. nocens*, *A. (P.) longa* e *Phagicola* sp., e si basano sull'analisi delle regioni 18S (small subunit), 28S e *cox-1* (citocromo ossidasi 1) del rDNA (Lee et al., 1999; Dzikowski et al., 2004; Martorelli et al., 2012,).

Delle metacercarie raggruppate in quattro gruppi in base alle caratteristiche morfologiche (sferiche, spinose, ellissoidali grandi e ellissoidali piccole), quelle identificate come sferiche e spinose, omogenee e ben caratterizzate corrispondono, rispettivamente, alle descrizioni di *Heterophyes* sp. e *Phagicola (Ascocotyle)* sp. fornite da Witenberg (1928), Scholz (1997), Pearson (2002), Portes Santos (2013). Nei restanti due gruppi eterogenei (metacercarie ellissoidali grandi e piccole) sono state incluse quelle non immediatamente ascrivibili a gruppi tassonomici ben definiti.

Le indagini morfometriche degli 8 individui adulti ottenuti con infestazione sperimentale ha permesso di identificarne sei come *H. heterophyes*, e due come *H. cf. nocens*, in particolare sulla base del numero degli scleriti presenti a livello del gonotile (Ransom, 1920; Witenberg, 1928; Waikagul e Pearson, 1989; Chai e Lee, 1990; Kino et al., 2002). Il reperto di adulti di *H. heterophyes* conferma le precedenti segnalazioni di eterofidi in ambienti lagunari dell'Isola (Deiana, 1961; Nieddu e Lochi, 1988; Scala et al., 1991) e del Mediterraneo in generale (Fahmy e

Selim, 1959; Paperna e Overstreet, 1981; Taraschewski 1984, 1985, 1987; Ejsheikha e Elshazly, 2008a, 2008b; Shin et al., 2009; Khalafalla et al., 2011).

L'identificazione di adulti apparentemente appartenenti alla specie *H. nocens* è eccezionale, in quanto questa specie è distribuita in Estremo Oriente (Giappone e Corea) (Onji, 1915; Asada, 1928; Suzuki et al., 1982; Kino et al., 2002; Chai e Lee, 1990, 2002; Chai et al., 2009; Sohn 2009) ed in Australia (Waikagul e Pearson, 1989). Quindi, nonostante le caratteristiche morfometriche degli esemplari repertati nelle presente indagine coincidano con le descrizioni riportate in letteratura, l'attribuzione a questa specie rimane incerta, e per tale motivo è identificata come *H. cf. nocens*.

Relativamente alle metacercarie spinose repertate nella presente indagine, non avendo potuto effettuare un'infestazione sperimentale, sono state ascritte al genere *Ascocotyle (Phagicola)* sulla base delle numerose e dettagliate descrizioni di questo genere (Burton, 1958; Witenberg, 1984; Scholz, 1999, 2000; Pearson 2008). Per quanto riguarda una loro possibile attribuzione di specie, in Sardegna e sul territorio nazionale sono state descritte le specie *Ascocotyle (Phagicola) italica* e *Ascocotyle (Phagicola) longicollis* (Alessandrini, 1906; Deiana, 1961; Nieddu e Lochi, 1988; Scala et al., 1991). Riguardo la seconda specie, Scholz (1999) la considera non valida e la include tra i molti sinonimi di *Ascocotyle (Phagicola) longa* Ransom, 1920. D'altro canto, rimangono incertezze anche relativamente a *A. (P.) italica*; infatti, a parte la descrizione originale basata su un unico esemplare (Alessandrini, 1906), e sporadiche segnalazioni in Medio Oriente, penisola italiana e Sardegna (Witenberg, 1929, Nardi, 1959, Deiana, 1961), questa specie non è stata ulteriormente descritta, se si eccettua la segnalazione in un cane in Turchia (Tinar, 1976). Quindi, il suo status dovrebbe essere considerato come dubbio, anche in accordo con Burton (1958) che la include tra le specie con descrizione incompleta e per le quali sono necessarie ulteriori indagini per verificarne la validità.

I risultati dell'analisi molecolare di metacercarie ed adulti hanno evidenziato quattro cluster principali, ciascuno dei quali raggruppa le

metacercarie dei quattro diversi morfotipi (sferiche, ellissoidali grandi, ellissoidali piccole e spinose), confermando l'importanza di una prima attenta osservazione delle caratteristiche morfologiche generali allo stereomicroscopio. I quattro esemplari adulti sottoposti ad indagini biomolecolari (tre identificati morfologicamente come *H. heterophyes*, e uno come *H. cf. nocens*) hanno clusterizzato in maniera univoca con il gruppo delle metacercarie sferiche. Questo conferma l'identificazione di queste metacercarie come *H. heterophyes*, ed eventualmente *H. cf. nocens*.

Il fatto che tutti gli individui adulti siano raggruppati nello stesso cluster, nonostante uno, in base alle osservazioni morfologiche, sia stato ascritto a *H. cf. nocens*, potrebbe confermare la presenza di un'unica specie, come suggerito da Leiper (1922), Lane (1922) e Asada (1934); oppure che il numero degli scleriti del gonotile non sia un carattere utile per discriminare le due specie; o ancora che la porzione della regione genomica considerata nel presente studio (ITS2), possa essere poco adatta alla tassonomia molecolare di questo genere. Tale aspetto merita di essere approfondito, ed ulteriori studi sono quindi necessari per dimostrare la validità di questa specie e dei caratteri morfologici e molecolari utilizzati per differenziarla dalle altre.

Comparando i risultati della classificazione su base morfologica delle metacercarie con quelli molecolari, solo una metacercaria identificata come sferica, non ha confermato la classificazione, ed ha clusterizzato nel gruppo delle ellissoidali piccole. Ciò può essere spiegato con il fatto che queste ultime, pur non ascritte in un primo tempo a nessun taxon, ma morfologicamente affini ad *Heterophyes* sp., in seguito all'analisi molecolare sono risultate strettamente affini a tale genere, al quale presumibilmente appartengono. Si può quindi ipotizzare che l'errore di classificazione su base morfometrica sia da attribuire alla variabilità dei caratteri morfologici delle metacercarie del genere *Heterophyes*.

I risultati relativi alla presenza degli eterofidi confermano quelli di precedenti indagini che documentano la grande diffusione di questo gruppo di

parassiti negli ambienti lagunari della Sardegna (Deiana, 1961; Nieddu e Lochi, 1988; Scala et al., 1991; Marino, 2003; Merella et al., 2004). Lochi (1986) e Nieddu e Lochi (1988) non riportano dati epidemiologici completi, ma indicano valori di prevalenza nei muggini prossimi al 100%, e valori di intensità totale sino a 6.259 metacercarie per ospite. Merella et al. (2004), in uno studio sulle metacercarie del cuore dei muggini degli stagni di Cabras e Mistras, riportano, relativamente alla prima località, la sola presenza di *Ascocotyle* sp. con valori di prevalenza e intensità media pari, rispettivamente, a 86% e 141, mentre per quanto riguarda la seconda località descrivono la presenza sia di *Heterophyes* sp. sia di *Ascocotyle* sp. con prevalenza pari a 62% e intensità media 62.

Valori simili sono presenti nelle regioni del Mediterraneo dove la zoonosi è diffusa, come riportato da Balozet e Callot (1939) in Tunisia, Mimioglu e Sayin (1957) in Turchia, Paperna (1975) in Israele, e Wells e Randall (1956), Hamed e Elias (1970), Paperna e Overstreet (1981), e Elsheikha e Elshazly (2008) in Egitto. Questi autori valutano nei mugilidi prevalenze comprese tra 70% e 100% ed intensità totali sino a più di 500.000 metacercarie per ospite.

I livelli di infestazione di metacercarie nel muscolo sono risultati elevati per tutte le specie ospite esaminate. *M. cephalus* è risultata la specie maggiormente infestata, nella quale i livelli di infestazione (soprattutto intensità media) si sono dimostrati significativamente superiori rispetto agli altri ospiti, soprattutto per i due gruppi di metacercarie ascritte al genere *Heterophyes*: le sferiche (P, 100%; Im, 841 mtc/100 g muscolo), e le ellisoidali piccole (P, 47%; Im, 336 mtc/100 g muscolo), con picchi di oltre 2.000 mtc/100 g muscolo. Questi dati confermano che *M. cephalus* sarebbe la specie ospite preferenziale per i parassiti del genere *Heterophyes*.

Da rilevare in ogni caso che il morfotipo sferiche è stato repertato con elevati livelli di infestazione anche nelle altre specie ospite ($P \geq 78\%$, $Im \geq 135$ mtc/100 g muscolo).

La presenza del morfotipo spinose, ascritto al genere *Ascocotyle* (*Phagicola*), è relativamente limitata, e le specie maggiormente infestate sono

risultate: *C. labrosus*, *L. aurata* e *L. saliens*. Una minore presenza di metacercarie del genere *Ascocotyle* (*Phagicola*) nello stagno di Mistras rispetto ad *Heterophyes* era già stata messa in evidenza da Marino (2003), che segnala la presenza di *Ascocotyle* (*Phagicola*) sp. soprattutto nello Stagno di Cabras, imputando tali differenze soprattutto alla salinità. Infatti, lo Stagno di Cabras è di tipo oligoalino, mentre quello di Mistras è eu-iperlino.

Secondo Paperna e Overstreet (1981), la presenza di *Heterophyes* sp. è favorita dall'elevata salinità e dalla grande variabilità delle condizioni ambientali. In tali situazioni il gasteropode *P. conica* (primo O.I.) può costituire consistenti popolazioni che favoriscono la presenza del parassita. Questo stretto legame di *Heterophyes* con gli ambienti lagunari eu-iperalini è anche testimoniato dall'elevata eurialità della cercaria, capace di sopravvivere a salinità comprese tra 22‰ e 60‰ (Paperna e Overstreet, 1981). Differentemente *Ascocotyle* (*Phagicola*) non è vincolata ad ambienti ad elevata salinità, infatti, i suoi secondi O.I. sono, oltre che i mugilidi, anche numerose specie ittiche di acqua dolce, come ciprinidi, ciprinodontidi, eleotridi e poecilidi (Witenberg, 1929; Euzéby, 1975; Scholz et al., 2001).

Tra i generi identificati nella presente indagine, *Heterophyes* è uno dei più importanti agenti di eterofidiosi umana, anche se alcune specie di *Ascocotyle*, tra cui *A. (P.) longa*, sono in grado di infestare l'uomo (Taraschewski, 1985; Chai et al., 1986; Chieffi et al., 1990, 1992; Almeida Dias e Woiciechowski, 1994; Antunes e Almeida Dias, 1994; Manfredi e Oneto, 1997).

I risultati ottenuti indicano pertanto la presenza di un potenziale pericolo per la salute del consumatore, dovuto alla presenza di metacercarie zoonosiche nelle specie ittiche commerciali dello Stagno di Mistras.

Appurata la presenza di un pericolo, si prefigura la necessità di valutare il rischio per il consumatore. Il rischio eterofidiosi è correlato al consumo di pesci (soprattutto mugilidi) crudi o non sottoposti a trattamenti in grado di garantire la devitalizzazione delle metacercarie. Ciò è chiaramente deducibile anche dall'analisi dell'epidemiologia di questa zoonosi, strettamente legata

all'abitudine a consumare preparazioni a base di pesce crudo o poco cotto, tipiche del Medio e dell'Estremo Oriente, o del Sud America.

L'unico sistema che può tutelare la salute del consumatore consiste nella devitalizzazione del parassita mediante trattamenti termici ad alte (cottura) o basse (congelamento) temperature. Da rilevare però che le metacercarie di trematodi sono straordinariamente resistenti al congelamento e sopravvivono sino a 30 ore a -20° C e (Hamed e Elias, 1970), e 40 ore a -10° C (Abdallah et al., 2009). A temperature di refrigerazione (tra +2 e +6° C) la sopravvivenza può variare tra 9 e 13 giorni (Hamed e Elias, 1970; Abdussalam et al., 1995; Abdallah et al., 2009), superando pertanto di gran lunga la vita commerciale dei pesci refrigerati. Per quanto riguarda le alte temperature, sempre Hamed e Elias (1970), riportano che la cottura a 50° C determina la devitalizzazione delle metacercarie dopo circa 195 minuti, la cottura a 100° C devitalizza le stesse dopo 10 minuti, mentre dopo una cottura diretta sulla brace (metodo tradizionale dei pescatori egiziani) circa il 20-30% dei pesci alberga metacercarie con potere infestante per l'uomo. Abdallah et al. (2009) rilevano che alla temperatura di bollitura la devitalizzazione delle larve è assicurata in pochi minuti, e la frittura ne riduce la vitalità dopo 5 minuti e le uccide dopo 10. Il rischio di contrarre la zoonosi quindi deriva non solo dal consumo di pesce crudo, ma anche da quello non sufficientemente cotto. Altri trattamenti, impiegati per preparazioni alimentari quali salagione, affumicatura a freddo o marinatura non sono in grado di devitalizzare le metacercarie (Muller, 2001; Beldsoe e Oria, 2001), ma possono solo ridurre la vitalità e potere infestante (El-Zawawy, 2008).

Le difficoltà di un'efficace profilassi nei confronti delle metacercarie nei pesci sono anche messe in evidenza nel "Regolamento 1276/2011 dell'8 dicembre 2011, che modifica l'allegato III del regolamento (CE) n. 853/2004", ove relativamente al trattamento per la devitalizzazione di parassiti vitali in prodotti della pesca destinati al consumo umano, fa per la prima volta una distinzione tra trematodi ed altri parassiti. In realtà la norma non è esplicativa sul comportamento da tenersi nell'eventualità di pesce infestato da trematodi, ma

indica semplicemente come le misure idonee per la profilassi degli altri parassiti non siano valide per i trematodi. Indicazioni pratiche sui trattamenti atti a devitalizzare stadi larvali di trematodi (con particolare riferimento al genere *Opistorchis*) sono riportate in una nota Informativa del Ministero della Salute del 27 febbraio 2008, che stabilisce che al fine di prevenire l'infestazione nell'uomo "le parti edibili del pesce possono essere disattivate mediante cottura (ad almeno 65° C per un minuto) o congelamento (-20° C per una settimana)", sottolineando che "altri trattamenti come marinatura, salagione e affumicatura non garantiscono l'inattivazione del parassita".

Nonostante in Italia, ed in particolare in Sardegna, la presenza di eterofidi zoonosici sia stata segnalata tanto negli ospiti intermedi che in quelli definitivi (Deiana, 1961; Nieddu e Lochi, 1988; Scala et al., 1991; Marino, 2003; Merella et al., 2004), e che la presente indagine ne abbia confermato la presenza, fornendo dati quantitativi che indicano una rilevante presenza di questi parassiti nel muscolo dei muggini, non sono noti casi di infestazioni umane nell'Isola.

L'assenza di segnalazioni di casi di eterofidiosi umana in Sardegna può essere dovuta a differenti fattori: (i) in primo luogo, le preparazioni tradizionali di questi pesci tipiche dell'Isola (muggine arrosto e bollito), garantendo elevate temperature, sono sufficienti per la devitalizzazione delle metacercarie (Hamed e Elias, 1970; Abdussalam et al., 1995; Abdallah et al., 2009); (ii) spesso le infestazioni umane da eterofidi passano inosservate in considerazione dell'assenza di sintomi patognomnici, ma anche perché esse risultano clinicamente manifeste solo nelle infestazioni sostenute da un elevato numero di parassiti (Muller, 2001); (iii), la diagnosi copromicroscopica è resa difficile sia dal basso numero di uova emesso dagli adulti (Ryang et al., 1999), sia perché queste possono essere confuse con quelle di trematodi epatici (Muller, 2001); (iv) infine, da non sottovalutare una difficoltà diagnostica derivante dalla scarsa conoscenza di questa patologia da parte dei medici del nostro territorio.

In conclusione, l'eterofidiosi da *Ascocotyle* sp. ed *Heterophyes* sp. potrebbe rappresentare un pericolo derivante dal consumo di muggini degli stagni

dell'oristanese, soprattutto qualora si diffondano pratiche di preparazione diverse da quelle tradizionali, quali carpaccio, sushi, sashimi, ceviche, salatura leggera, affumicatura a freddo, cottura superficiale, etc., che senza le dovute misure di profilassi non sono capaci di devitalizzare i parassiti. Si rende quindi necessaria una specifica educazione degli operatori del settore e dei consumatori, al fine mettere in atto le opportune misure di profilassi, che se regolarmente applicate impediscono la trasmissione della parassitosi all'uomo. Infatti, tali misure oltre che garantire la salute dell'uomo potranno evitare quegli inutili allarmismi che potrebbero compromettere la commercializzazione e valorizzazione dei prodotti ittici di questo territorio, che rappresentano sia un'importante componente economica, che uno dei più rilevanti aspetti identitari e culturali.

CAPITOLO 5

ANALISI CRITICA DELLA NORMATIVA RELATIVA AL CONTROLLO DELLE ZONOSI PARASSITARIE DI ORIGINE ITTICA

La presenza dei parassiti nelle specie ittiche in fase di commercializzazione riveste una duplice importanza, la prima legata all'aspetto igienico sanitario del prodotto, la seconda invece relativa al valore merceologico del prodotto. Le zoonosi da consumo di prodotti ittici infestati da parassiti sono molteplici, e tra le più importanti, oltre all'anisakidosi e l'eterofidosi oggetto della presente tesi, meritano di essere ricordate l'opistorchiasi e la plerocercosi (WHO, 1995; Chai et al., 2005). Inoltre, la presenza di infestazioni parassitarie, anche se non associate a zoonosi, può suscitare repulsione o allarme nel consumatore finale, e questo può essere un fattore limitante l'acquisto ed il consumo dei prodotti ittici, con conseguenti danni economici per il comparto.

Per questi motivi il legislatore si è adoperato per emanare provvedimenti che potessero orientare le aziende, i consumatori e gli enti preposti al controllo alla prevenzione, per evitare e prevenire le possibili conseguenze derivanti dalla presenza di parassiti nei prodotti della pesca. Di seguito è riportato un breve cenno sui differenti riferimenti normativi relativi alla presenza e alla gestione del rischio associato alle infestazioni parassitarie nelle specie ittiche.

Nel Regolamento di Polizia Veterinaria (D.P.R. n. 320 dell'8 febbraio 1953, Suppl. G.U. n. 142 del 24-06-1954) la plerocercosi sostenuta da *Diphyllbothrium latum* risulta tra le malattie infettive e diffuse soggette a denuncia. In particolare, nell'articolo 159, è prevista la distruzione dei pesci infestati da larve plerocercoidi di *D. latum*, e l'applicazione di norme igieniche atte ad impedire la diffusione del parassita.

In quanto alimenti, i prodotti ittici sono presi in considerazione dalla Legge Quadro sulle sostanze alimentari (**Legge n. 283 del 30 aprile 1962**), che all'articolo 5, lettera d, sancisce il divieto di detenzione e messa in circolazione, a qualsiasi titolo, di sostanze alimentari "invase da parassiti".

Le prime norme adottate nei paesi europei per il controllo del rischio *Anisakis* risalgono al 1968, quando nei Paesi Bassi furono promulgate le leggi sulle "Green Herring" (aringhe leggermente marinate). La produzione di questa tipologia alimentare prevedeva infatti l'obbligo del congelamento delle aringhe

fresche prima della messa in commercio, in modo da raggiungere entro 12 ore la temperatura -20° C, che doveva poi essere mantenuta nelle successive 24 ore. Nei 10 anni successivi all'entrata in vigore di questi provvedimenti normativi, il numero di casi umani diminuì drasticamente passando da 40-50 a meno di 10 per anno.

In seguito, negli anni novanta il numero di casi di anisakiasi aumentò notevolmente in diversi Paesi d'Europa, e sull'onda di diverse campagne allarmistiche, il legislatore si concentrò in particolare su questa zoonosi.

Nel 1992, il Ministero della Sanità, con la **Circolare n. 10 del 11 marzo 1992** "*Direttive e raccomandazioni in merito alla presenza di larve di Anisakis nel pesce*", stilava un elenco di specie ittiche più frequentemente infestate da questo parassita. La stessa Circolare, e la successiva **Ordinanza Ministeriale del 12 maggio 1992**, raccomandavano agli operatori del settore alimentare (OSA) di questa specifica filiera, di provvedere ad una tempestiva eviscerazione delle specie target come aringhe, sgombri, tracuri, melù, pesce sciabola, merluzzi, acciughe, sardine e triglie di pezzatura superiore ai 18 cm. Tale norma era però di difficile attuazione, ed in pratica non venne mai applicata, anche perché non avrebbe raccolto il consenso dei consumatori, non abituati all'acquisto di pesce eviscerato.

Un importante passo avanti venne fatto successivamente, con il **Decreto Legislativo n. 531 del 30 dicembre 1992**, "*Attuazione della direttiva 493/91 CEE, che stabilisce le norme sanitarie applicabili alla produzione e alla commercializzazione dei prodotti della pesca*" (abrogato dal D.Lgs. n. 193 del 06 novembre 2007, in applicazione della Direttiva 41/2004/CE).

Nell'Allegato unico, capitolo IV, punto V, venivano date una serie di disposizioni relative ai parassiti:

"1. Durante la produzione e prima dell'immissione sul mercato per il consumo umano i pesci e i prodotti ittici devono essere sottoposti ad un controllo visivo per la ricerca e l'asportazione dei parassiti visibili. I pesci o le parti asportate di pesci che presentano manifestamente parassiti non devono essere immessi sul

mercato per il consumo umano. Le modalità del controllo sono adottate secondo la procedura comunitaria.

2. I pesci e i prodotti ittici di cui al punto 3 destinati ad essere consumati tal quali devono inoltre essere sottoposti ad un trattamento di congelazione a temperatura pari o inferiore a -20° C all'interno del pesce per almeno 24 ore, trattamento che deve essere eseguito sul prodotto crudo o sul prodotto finito.

3. I pesci e prodotti ittici seguenti sono soggetti alle condizioni di cui al punto 2:

a) i pesci che vanno consumati crudi o praticamente crudi, come le aringhe giovani (maatje);

b) le specie seguenti se devono essere sottoposte ad un trattamento di affumicatura a freddo durante il quale la temperatura all'interno del pesce è inferiore a 60° C:

– aringhe,

– sgombri,

– spratti,

– salmoni selvatici dell'Atlantico e del Pacifico;

c) le aringhe marinate e/o salate se il trattamento praticato non garantisce l'inattivazione delle larve di nematodi.

L'elenco suddetto può essere modificato sulla scorta di dati scientifici, secondo la procedura prevista dall'articolo 15 della presente direttiva. Secondo la stessa procedura sono fissati i criteri che consentono di definire i trattamenti considerati sufficienti o insufficienti per distruggere i nematodi.

4. I produttori devono accertare che i pesci e i prodotti ittici di cui al punto 3 o le materie prime destinate alla loro preparazione abbiano subito, prima di essere immessi al consumo, il trattamento di cui al punto 2.

5. I prodotti della pesca di cui al punto 3 devono essere accompagnati, alla loro immissione sul mercato, da un'attestazione del fabbricante che indichi il trattamento al quale sono stati sottoposti.”.

Tale norma stabilisce l'obbligo del "controllo visivo" del pescato prima della sua immissione sul mercato, ai fini della ricerca e dell'asportazione di parassiti visibili, definendo "parassita visibile" un parassita che per dimensione, colore e struttura è chiaramente distinguibile nei tessuti del pesce, e "controllo visivo" l'esame non distruttivo dei prodotti della pesca, condotto senza l'ausilio di mezzi di ingrandimento ottico, in condizioni di buona illuminazione per l'occhio umano e, se necessario, mediante la speratura. I pesci o le parti di pesce con presenza manifesta di parassiti non possono essere destinati al consumo umano.

A partire dal primo gennaio 2005, con l'attuazione del **Reg. (CE) 178/02**, e successivamente, con quella dei Regolamenti che costituiscono il cosiddetto **Pacchetto Igiene (Reg. CE 852, 853, 854, 882/2004 e 2073/2005)** la gestione normativa si è spostata in senso orizzontale, ovvero su un piano generale ed uniforme su tutto il territorio dell'UE, individuando principi generali relativi alla sicurezza alimentare, e prescindendo dalla tipologia di prodotto o dalla categoria merceologica.

Il Pacchetto Igiene ha introdotto grandi innovazioni dal punto di vista delle responsabilità nel fornire garanzie di sicurezza sugli alimenti, attribuite per lo più all'OSA. Dal punto di vista delle misure da adottare per la gestione del "pericolo parassiti" ha lasciato la situazione sostanzialmente immutata.

Il **Regolamento (CE) n. 853/2004** e successive modifiche e integrazioni (s.m.i.) che "*stabilisce norme specifiche in materia di igiene per gli alimenti di origine animale*", all'Allegato III, Sezione VIII, Capitolo III, Lettera A, Punto 2, prevede che le operazioni quali la decapitazione e l'eviscerazione siano effettuate nel rispetto delle norme igieniche e, quando possibile, l'eviscerazione deve essere praticata il più rapidamente possibile dopo la cattura o lo sbarco.

Nell'allegato III, sezione VIII, capitolo III, punto D sono indicate le misure specifiche per i parassiti, che come accennato ricalcano quanto detto dal Decreto Legislativo n. 531:

“D. REQUISITI RELATIVI AI PARASSITI

1. I prodotti ittici di seguito precisati devono essere congelati a una temperatura non superiore a -20°C in ogni parte della massa per almeno 24 ore; il trattamento dev'essere eseguito sul prodotto crudo o sul prodotto finito:

- a) i prodotti della pesca che vanno consumati crudi o praticamente crudi;*
- b) i prodotti della pesca a base delle specie seguenti, se devono essere sottoposti ad un trattamento di affumicatura a freddo durante il quale la temperatura all'interno del prodotto non supera i 60°C :*

i) aringhe,

ii) sgombri,

iii) spratti,

iv) salmone (selvatico) dell'Atlantico e del Pacifico;

c) prodotti della pesca marinati e/o salati se il trattamento praticato non garantisce la distruzione delle larve di nematodi.

2. Gli operatori del settore alimentare non sono obbligati a praticare i trattamenti di cui al paragrafo 1 qualora:

- a) i dati epidemiologici disponibili indichino che le zone di pesca d'origine non presentano rischi sanitari con riguardo alla presenza di parassiti;*
- b) le autorità competenti lo autorizzino.*

3. I prodotti della pesca di cui al paragrafo 1 devono essere accompagnati, alla loro immissione sul mercato, da un'attestazione del produttore che indichi il trattamento al quale sono stati sottoposti, salvo qualora siano forniti al consumatore finale.”.

Secondo quanto stabilito da Capitolo V punto A *“Norme sanitarie per i prodotti della pesca”* rimane responsabilità dell'OSA, l'obbligo di *“assicurare le caratteristiche organolettiche dei prodotti mediante l'effettuazione di un esame organolettico dei prodotti della pesca. In particolare, tale esame deve garantire che i prodotti della pesca soddisfano tutti i criteri di freschezza”*. Ancora al punto D la stessa norma stabilisce che *“gli operatori del settore alimentare devono assicurare che i prodotti della pesca siano sottoposti ad un controllo visivo alla*

ricerca di endoparassiti visibili prima dell'immissione sul mercato. Gli operatori non devono immettere sul mercato per il consumo umano i prodotti della pesca manifestamente infestati da parassiti".

Il Regolamento (CE) n. 2074/2005 del 5 dicembre 2005 e s.m.i. ribadisce la responsabilità dell'OSA nel campo del controllo dei parassiti dei pesci e fornisce delle indicazioni pratiche relativamente al controllo visivo dei pesci. Secondo le modalità prescritte in tale regolamento risultano sottoposti all'obbligo di controllo visivo per la ricerca di parassiti nei prodotti della pesca, gli operatori delle attività successive alla produzione primaria:

"1. Il controllo visivo è effettuato su un numero rappresentativo di campioni. I responsabili degli stabilimenti a terra e le persone qualificate a bordo delle navi officina determinano, in funzione della natura dei prodotti della pesca, della loro origine geografica e del loro impiego, l'entità e la frequenza dei controlli. Durante la produzione, il controllo visivo del pesce eviscerato dev'essere effettuato da persone qualificate sulla cavità addominale, i fegati e le gonadi destinati al consumo umano. A seconda del metodo di eviscerazione utilizzato, il controllo visivo dev'essere eseguito:

a) in caso di eviscerazione manuale, dall'addetto, in modo continuativo, al momento dell'estrazione dei visceri e del lavaggio;

b) in caso di eviscerazione meccanica, per campionamento, effettuato su un numero rappresentativo di unità, costituito da almeno dieci esemplari per partita.

2. Il controllo visivo dei filetti o dei tranci di pesce dev'essere effettuato dagli operatori durante la preparazione successiva alla sfilettatura o all'affettatura. Qualora le dimensioni dei filetti o le tecniche di sfilettatura non consentano un controllo individuale, un piano di campionamento deve essere predisposto e tenuto a disposizione dell'autorità competente, a norma dell'allegato III, sezione VIII, capitolo II, punto 4, del regolamento (CE) n. 853/2004. Qualora sia tecnicamente necessaria, la speratura dei filetti dovrà essere inclusa nel piano di campionamento".

L'obiettivo della norma è in questo caso assicurare che non vengano commercializzati alimenti nei quali sono presenti parassiti visibili, e quindi considerati "inadatti al consumo umano" sia ai sensi del Regolamento (CE) n. 178/2002, ma ancora anche in relazione alla sempre vigente Legge n. 283, articolo 5, lettera d. Rimane comunque il fatto che operando secondo quanto stabilito dalla norma non si raggiunge un obiettivo di sicurezza (che è possibile garantire solo mediante i trattamenti termici di cottura o congelamento), ma solo di idoneità al consumo. Per raggiungere questo risultato, in linea con quanto affermato in un parere del 2005 della DG-SANCO (Directorate General for Health and Consumers), la Direzione Generale Salute e Consumatori, (DGSAN 421164-D2/PCA/ca D 2005), l'OSA può procedere alla distruzione dei visceri infestati ed alla toelettatura delle parti che presentano parassiti visibili, destinando anch'esse alla distruzione. Le parti di pesce che non presentano infestazioni all'esame visivo possono essere regolarmente commercializzate.

Anche in caso di assenza di riscontro di parassiti visibili devono comunque essere applicate le misure previste dal regolamento (CE) n. 853/2004 e s.m.i., e quindi l'obbligo del congelamento o del trattamento termico, in quanto solo mediante l'applicazione di questi trattamenti termici, si è in grado di eliminare il rischio per il consumatore finale. Ciò si rende necessario in quanto, come è noto, alcuni parassiti non sono visibili ad occhio nudo, e non esiste un metodo riconosciuto in grado di identificare con certezza la presenza o l'assenza di parassiti in una partita di pesci.

Sono quindi due gli obiettivi perseguiti dal regolamento (CE) n. 853/2004 e s.m.i.:

- evitare pericoli per il consumatore finale (alimento a rischio in quanto "dannoso") mediante l'obbligo per gli OSA di commercializzare esclusivamente prodotti ittici cotti o congelati o accompagnati dalle informazioni in grado di garantire la devitalizzazione di eventuali parassiti presenti (es. corrette modalità di cottura, corrette modalità di congelamento).

- evitare la commercializzazione di parti commestibili di pesci con la presenza di parassiti visibili (manifestatamente o palesemente infestati, alimento “inadatto al consumo umano”) mediante l’obbligo da parte dell’OSA di un esame visivo .

Il **Regolamento (CE) n. 1020/2008** e s.m.i. “*modifica gli allegati II e III del Regolamento (CE) n. 853/2004*”, stabilendo che gli obblighi relativi al controllo dei parassiti siano estesi anche alla vendita al dettaglio.

Il **Regolamento 1276/2011 dell’8 dicembre 2011** modifica l’allegato III del regolamento (CE) n. 853/2004 relativamente al trattamento per la devitalizzazione di parassiti vivi e vitali in prodotti della pesca destinati al consumo umano stabilendo quanto segue:

“D. REQUISITI RELATIVI AI PARASSITI

1. Gli operatori del settore alimentare che immettono sul mercato i seguenti prodotti della pesca derivati da pesci pinnati o molluschi cefalopodi:

a) i prodotti della pesca che vanno consumati crudi o praticamente crudi; oppure

b) i prodotti della pesca marinati, salati e qualunque altro prodotto della pesca trattato, se il trattamento praticato non garantisce l’uccisione del parassita vivo, devono assicurarsi che il materiale crudo o il prodotto finito siano sottoposti ad un trattamento di congelamento che uccide i parassiti vivi potenzialmente rischiosi per la salute dei consumatori.

2. Per i parassiti diversi dai trematodi il congelamento deve consistere in un abbassamento della temperatura in ogni parte della massa del prodotto fino ad almeno:

a) - 20° C, per almeno 24 ore; oppure

b) - 35° C, per almeno 15 ore.

3. Gli operatori del settore alimentare non sono tenuti a praticare i trattamenti di congelamento di cui al punto 1 per i prodotti della pesca:

a) sottoposti, o destinati ad essere sottoposti, ad un trattamento termico che uccide il parassita vivo prima del consumo. Nel caso di parassiti diversi

dai trematodi il prodotto è riscaldato ad una temperatura al centro del prodotto superiore o uguale a 60° C per almeno un minuto;

b) che sono stati conservati come prodotti della pesca congelati per un periodo di tempo sufficiente ad uccidere i parassiti vivi;

c) derivanti da cattura in zone di pesca non di allevamento, a condizione che:

i) esistano dati epidemiologici indicanti che le zone di pesca d'origine non presentano rischi sanitari con riguardo alla presenza di parassiti; e

ii) le autorità competenti lo autorizzino;

d) derivati da piscicoltura, da colture di embrioni e nutriti esclusivamente secondo una dieta priva di parassiti vivi che rappresentano un rischio sanitario, e purché uno dei seguenti requisiti sia soddisfatto:

i) sono stati allevati esclusivamente in un ambiente privo di parassiti vivi; oppure

ii) l'operatore del settore alimentare verifica mediante procedure approvate dall'autorità competente che i prodotti della pesca non rappresentano un rischio sanitario con riguardo alla presenza di parassiti vivi".

L'innovazione di tale norma sta nel fatto che, in base al parere dell'European Food Safety Authority (EFSA), che considera trascurabile la presenza di *Anisakis* nei pesci allevati ed alimentati con mangime composito, detti prodotti potrebbero essere esentati dall'obbligo di congelamento senza che venga compromesso un livello elevato di protezione della salute.

Inoltre, per la prima volta viene fatta una distinzione tra trematodi e parassiti diversi dai trematodi, anche se la norma non è esplicita quale comportamento debba tenere l'OSA nel caso di infestazioni da trematodi nei prodotti ittici destinati al consumo. Non sono infatti definite combinazioni di tempo e temperatura in grado di devitalizzare le metacercarie presenti nel muscolo del pesce, e inoltre una lettura superficiale della norma potrebbe

portare l'OSA a pensare che tali parassiti non rappresentino un problema per la salute del consumatore.

Relativamente ai trematodi, con particolare riferimento al genere *Opisthorchis* in Italia è stata emanata una **Nota Informativa del Ministero della Salute del 27 febbraio 2008** avente come oggetto *“Emergenza dell’opistorchiasi nell’Italia centrale”*. Tale nota stabilisce che *“al fine di prevenire l’infestazione nell’uomo, le metacercarie presenti nella parte edibile del pesce sono disattivate mediante cottura (ad almeno 65° C per un minuto) o congelamento (-20° C per una settimana)”* sottolineando che *“altri trattamenti come marinatura, salagione e affumicatura non garantiscono l’inattivazione del parassita”*. La stessa nota *“suggerisce inoltre di fornire a livello territoriale alcune misure precauzionali”* quali:

- un’adeguata formazione del personale veterinario operante nel SSN, degli addetti alla ristorazione, e alla commercializzazione del pesce d’acqua dolce e più in generale ai consumatori;
- commercializzazione controllata con l’indicazione *“da consumarsi previa cottura o congelamento a -20° C per una settimana”*;
- indagini conoscitive sul pescato proveniente da altri laghi, invasi e bacini lacustri dell’Italia settentrionale, centrale meridionale ed insulare, per monitorare la diffusione di questo patogeno nelle specie ittiche ivi presenti, con particolare riguardo a quelle della famiglia Cyprinidae.

Il recente **Decreto del Ministro della Salute del 17 luglio 2013** riporta *“Informazioni obbligatorie a tutela del consumatore di pesce e cefalopodi freschi e di prodotti di acqua dolce, in attuazione dell’articolo 8, comma 4, del decreto-legge 13 settembre 2012 n. 158, convertito, con modificazioni, dalla legge 8 novembre 2012, n. 189”*. All’articolo 2 stabilisce che *“l’operatore del settore alimentare che offre in vendita al consumatore finale pesce anche di acqua dolce e cefalopodi freschi, sfusi o preimballati per la vendita diretta ai sensi dell’art. 44 del regolamento (CE) 1169/2011 deve esporre apposito cartello”* con le informazioni di seguito riportate: *“In caso di consumo crudo, marinato o non*

completamente cotto il prodotto deve essere preventivamente congelato per almeno 96 ore a -18° C in congelatore domestico contrassegnato con tre o più stelle”.

Altro aspetto da tenere in considerazione è quello relativo alla ristorazione, che è probabilmente una delle fasi della filiera più a rischio. Nel Febbraio 2011, sono state emanate le circolari **DGSAN 4379-P-17/02/2011** e **DGSAN 4380-P-17/02/2011**. Nella prima circolare, in particolare, vengono fornite indicazioni operative concernenti la vendita e somministrazione di preparazioni gastronomiche contenenti prodotti della pesca destinati ad essere consumati crudi o praticamente crudi: *“nel caso in cui un esercizio di somministrazione acquisti prodotti della pesca già sottoposti al trattamento considerato, da destinarsi ad essere consumati crudi o in preparazioni gastronomiche ove rimangono praticamente crudi, dovrà richiedere al fornitore la prevista certificazione, da tenere agli atti ed esibire a richiesta degli organi di controllo. Il trattamento di bonifica preventiva può essere applicato anche direttamente presso l’esercizio di somministrazione; in tal caso l’OSA deve poter fornire le dovute garanzie, oggettivamente valutabili da parte dell’autorità competente, di conformità ed efficacia del trattamento di bonifica preventiva, in altri termini il raggiungimento e mantenimento della temperatura di -20° C a cuore del prodotto per non meno di 24 ore. In relazione alla pezzatura del prodotto ittico e dei parassiti considerati dovrà stabilire il periodo di trattamento ai fini della sua efficacia”.*

Alla luce della normativa vigente e della sua evoluzione, e considerando i risultati della presente indagine e quelli riportati in letteratura, è importante sottolineare che sia gli OSA che gli operatori del SSN nel momento in cui eseguono controlli sui prodotti ittici per la ricerca di parassiti, abbiano ben presente che non vi è stretta correlazione tra presenza di parassiti nei visceri o sulla superficie dei pesci e un preciso pericolo per il consumatore. Esistono infatti un gran numero di ecto ed endoparassiti di nessun interesse zoonosico, che potrebbero rendere il prodotto non commercializzabile solo in caso di

infestazioni massive, in quanto suscitano nel consumatore allarme o repulsione. Alla base di una buona riuscita degli interventi di controllo e profilassi delle zoonosi parassitarie di origine ittica è necessaria un'approfondita conoscenza di tutti gli agenti parassitari rilevabili nei pesci e nei cefalopodi.

È altresì vero che l'assenza di parassiti a livello della cavità celomatica o sulla superficie del pesce non esclude la presenza a livello muscolare, e quindi sicurezza per il consumatore. Come già precedentemente accennato infatti alcuni parassiti, quali le metacercarie di eterofidi, oggetto della presente indagine, non sono visibili ad un "attento controllo visivo". Anche la larve di terzo stadio di *Contracaecum* sp. (lunghe 3-6 mm) potenzialmente zoonosiche, sono difficilmente visibili senza l'ausilio di strumenti di ingrandimento.

Relativamente ad *Anisakis* c'è da dire che la presenza di nematodi visibili non è necessariamente ascrivibile a questo parassita. Esistono infatti nematodi non patogeni per l'uomo, quali quelli del genere *Hysterothylacium*, che sono indistinguibili ad un semplice esame visivo non specialistico (EFSA, 2010). Inoltre, la presenza di larve di parassiti in cavità addominale non è sempre riconducibile alla presenza delle stesse anche a livello muscolare, e quindi nelle parti edibili. Infatti non è ancora chiaro, in che misura, avvenga la migrazione a livello del muscolo e quali fattori influenzino questo fenomeno (EFSA, 2010).

Concludendo, solo l'applicazione di quanto stabilito dalla normativa, relativamente ai trattamenti termici con freddo e calore per la devitalizzazione dei parassiti, può garantire una adeguata sicurezza del consumatore finale. Inoltre, dopo gli opportuni esami ispettivi necessari per evitare la messa in commercio di prodotti manifestamente infestati, riveste un ruolo di primaria importanza nella prevenzione delle zoonosi parassitarie di origine ittica una corretta e puntuale educazione sanitaria applicata alle molteplici consuetudini alimentari dei consumatori, ma anche, come già detto, di OSA e operatori del SSN. A tal fine, campagne informative capillari, a partire da materiale divulgativo (volantini, poster) da diffondere presso i punti di vendita al dettaglio, possono avere ricadute positive evitando inutili allarmismi. Non da ultimo, un ruolo

importante nella diffusione di una corretta informazione potrebbe essere svolta dai social network, tenendo anche in considerazione che in alcuni siti di cucina non viene fatto alcun cenno alla problematica *Anisakis* nella ricetta delle alici marinate.

CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

I risultati della presente tesi hanno permesso di approfondire alcuni aspetti relativi alla morfologia, biologia molecolare, sistematica ed epidemiologia di parassiti agenti di zoonosi presenti in specie ittiche commerciali nelle acque della Sardegna.

Vengono per la prima volta forniti dati relativi a:

- identificazione molecolare ed epidemiologia di larve di terzo stadio del genere *Anisakis* in specie ittiche commerciali pescate nel Nord Sardegna;
- identificazione morfologica e molecolare, ed epidemiologia di larve di quarto stadio ed adulti di *Contracaecum rudolphii* (*sensu lato*) nei cormorani degli stagni dell'oristanese;
- identificazione morfologica, caratterizzazione molecolare, ed epidemiologia di metacercarie dei generi *Ascocotyle* ed *Heterophyes* nei muggini degli stagni dell'oristanese, ed identificazione morfologica degli adulti di *Heterophyes* spp. tramite infestazione sperimentale.

Per le specie delle quali esistevano precedenti descrizioni molecolari (*i.e.* *Anisakis* spp. e *Contracaecum* spp.) l'analisi molecolare ha permesso l'esatta identificazione a livello di specie, mentre quelle per cui gli studi molecolari sono limitati o assenti (*i.e.* *Ascocotyle* spp. ed *Heterophyes* spp.) sono state fornite le prime basi per una loro descrizione molecolare.

Questo aspetto della ricerca è di fondamentale importanza, in quanto fornisce informazioni sulla tassonomia delle diverse specie parassitarie, in particolare per quelle della famiglia Heterophyidae, la cui tassonomia è tuttora incerta. D'altro canto, all'interno dei generi *Anisakis* e *Contracaecum* esistono varie sibling species, la cui esatta identificazione fornisce informazioni sulla loro biologia, ma anche sulla distribuzione geografica ed ecologia dei loro ospiti.

In sintesi la ricerca ha fornito i seguenti risultati:

- Per *Anisakis* spp. le indagini molecolari hanno permesso di identificare le specie *A. pegreffii* e *A. physeteris* in dieci specie ittiche commerciali delle acque del Nord Sardegna. Non sono stati repertati ibridi tra le specie *A.*

pegreffii e *A. simplex* (s.s.). I dati raccolti confermano gli studi precedentemente effettuati nel Mar Mediterraneo occidentale, dove *A. pegreffii* e *A. physeteris* risultano essere le specie più diffuse.

- I dati epidemiologici relativamente ad *Anisakis* spp. sono analoghi a quelli riportati in precedenti studi effettuati in altre località della Sardegna e del Mar Mediterraneo occidentale in generale. Le alte prevalenze riscontrate in alcuni ospiti indicano la notevole diffusione del parassita nelle specie ittiche Mediterranee.
- Un dato particolarmente rilevante è l'alta infestazione di *A. pegreffii* nei piccoli pelagici, al contrario di quanto osservato in altre località mediterranee dove le prevalenze sembrano essere significativamente inferiori.
- Nel muscolo di quasi tutte le specie esaminate (9 su 10) sono state repertate larve appartenenti al genere *Anisakis*. L'elevata frequenza con cui sono stati riscontrati tali parassiti nel muscolo giustificano l'interesse e l'attenzione che il legislatore, gli OSA ed i consumatori hanno rivolto verso di questo parassita, e rimarkano la necessità di compiere ulteriori studi al riguardo.
- Tutti i 41 cormorani esaminati sono risultati positivi per la presenza di *Contracaecum* sp. Mediante analisi morfologica, le larve di quarto stadio sono state identificate come appartenenti al genere *Contracaecum*, e gli adulti come *C. rudolphii* (*sensu lato*).
- La prevalenza di *C. rudolphii* adulti è risultata pari a 100%, mentre quella delle L₄ 83%. Gli elevati livelli di infestazione di *C. rudolphii* negli ospiti definitivi indicano una rilevante presenza del parassita negli ambienti lagunari dell'oristanese.
- Le indagini molecolari hanno consentito di identificare due specie: *C. rudolphii* A (L₄ ed adulti) e *C. rudolphii* B (solo adulti). Questi dati sembrano confermare che *C. rudolphii* A è caratterizzato da un ciclo prevalentemente legato all'ambiente marino e salmastro, ed è la specie più diffusa nel Mediterraneo, mentre *C. rudolphii* B svolge il suo ciclo in ambienti dulciacquicoli ed è diffuso soprattutto nel centro Europa.

- Il confronto dei risultati delle indagini parassitologiche con quelli delle ricerche sui contenuti stomacali (ricerca svolta da un altro gruppo di ricerca sugli stessi campioni) suggerisce che svariate specie ittiche commerciali degli ambienti lagunari e costieri dovrebbero essere responsabili della trasmissione del parassita ai cormorani.
- Le indagini morfologiche svolte sulle metacercarie repertate nel muscolo dei muggini degli stagni dell'oristanese hanno permesso di definire la presenza di due generi: *Heterophyes* e *Ascocotyle (Phagicola)*. Due gruppi morfologici di metacercarie non sono stati ascritti a nessun taxon, pur presentando affinità morfologica con i generi *Heterophyes* e *Stictodora*.
- I risultati dell'analisi molecolare delle metacercarie hanno confermato la presenza di quattro gruppi principali, ciascuno dei quali raggruppa le metacercarie dei quattro diversi morfotipi.
- L'infestazione sperimentale di criceti con metacercarie prelevate da muggini ha consentito di ottenere adulti morfologicamente identificati come *H. heterophyes* ed *H. cf. nocens*. La prima specie è comune negli ambienti lagunari mediterranei, e riconosciuta come il principale agente di zoonosi nel Mar Mediterraneo, mentre la seconda è distribuita prevalentemente in Estremo Oriente (Giappone e Corea) ed Australia.
- L'analisi molecolare degli adulti ha raggruppato sia gli individui identificati come *H. heterophyes* che quelli come *H. cf. nocens* in un unico clade. Questo risultato suggerisce cautela sulla validità della specie *H. nocens*, o eventualmente sulle caratteristiche morfologiche utilizzate per discriminarla dalle altre specie.
- I risultati relativi alla presenza di eterofidi zoonosici nel muscolo di muggini dell'oristanese confermano la loro notevole diffusione negli ambienti lagunari della Sardegna, ed in particolare che i parassiti del genere *Heterophyes* sono i più diffusi, e che la specie ittica maggiormente coinvolta è *Mugil cephalus*.
- La presente indagine ha permesso di rilevare la presenza di parassiti di interesse zoonosico nelle specie ittiche commerciali dell'Isola. Tra questi,

quelli del genere *Anisakis* sono i più noti sul territorio nazionale, tanto agli OSA che al consumatore, anche in ragione del fatto che sono note alcune decine di casi umani in Italia, soprattutto meridionale. Mentre le infestazioni umane da *Contracaecum* sp. sono estremamente rare anche a livello mondiale, e quelle da *Heterophyes* sp. e *Ascocotyle (Phagicola)* sp., pur se estremamente frequenti in alcune aree mediterranee, del sud-est asiatico, estremo oriente e del Sud America, non sono mai state riscontrate in Italia.

- L'assenza di segnalazioni di casi umani in Sardegna causati dai parassiti studiati nella presente indagine, può prestarsi a varie interpretazioni: (a) le preparazioni tradizionali dell'Isola (pesce arrosto, bollito, zuppe) garantiscono elevate temperature, sufficienti per la devitalizzazione dei parassiti; (b) le infestazioni umane possono passare inosservate in considerazione dell'assenza di sintomi patognomici; (c) da non sottovalutare la difficoltà diagnostica dovuta alla scarsa conoscenza di queste patologie da parte dei medici del nostro territorio.
- Il potenziale zoonosico di questi parassiti è tuttavia noto, e potrebbe manifestarsi nel caso in cui si diffondano anche nel nostro territorio modalità di preparazione dei pesci diverse da quelle tradizionali (marinature, carpacci, affumicature a freddo). Si ritiene pertanto opportuno approfondire gli studi relativi alla presenza di questi agenti di zoonosi, ed alla loro resistenza ai trattamenti termici e chimici, in modo da fornire validi strumenti per definire adeguate misure di profilassi che possano garantire la sicurezza del consumatore.
- Infine, sono da prendere in considerazione campagne informative sulle modalità di profilassi di dette parassitosi, non solo presso i mercati locali ed i centri della grande distribuzione, ma anche attraverso i social network. Solo un'adeguata operazione culturale può fornire al consumatore gli strumenti per un'efficace profilassi. Inoltre, tale azione può contribuire ad evitare inutili allarmismi che possono compromettere la commercializzazione e valorizzazione dei prodotti ittici del territorio.

BIBLIOGRAFIA

- AAITO-IFIACI Anisakis Consortium, 2011. *Anisakis* hypersensitivity in Italy: prevalence and clinical features: a multicenter study. *Allergy*, 66: 1563-1569.
- Abdallah K.F., Hamadto H.H., El-Hayawan I.A., El-Motayam M.H., Ahmed W.A., 2009. Effect of different temperatures on viability of seven encysted metacercariae recovered from freshwater fishes in Qalyobia. *J. Egypt. Soc. Parasitol.*, 39: 413-42.
- Abollo E., D'amelio S., Pascual S., 2001a. Fitness of the marine parasitic nematode *Anisakis simplex* s.s. in temperate waters of the NE Atlantic. *Dis. Aquat. Org.*, 45: 131-139.
- Abollo E., Gestal C., Pascual S., 2001b. *Anisakis* infestation in marine fish and cephalopods in Galician waters: an update perspective. *Parasitol. Res.*, 87: 492-499.
- Abollo E., Gestal C., Pascual S., 2001c. Anisakid infection in the European shag *Phalacrocorax aristotelis aristotelis*. *J. Helminthol.*, 75: 209-14.
- Abollo E., Paggi L., Pascual S., D'Amelio S., 2003. Occurrence of recombinant genotypes of *Anisakis simplex* s.s. and *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae) in an area of sympatry. *Infect. Genet. Evol.*, 3: 175-181.
- Africa C.M., de Leon W., Garcia E.Y., 1940. Visceral complications in intestinal Heterophyidiasis of man. *Acta Med Philippina Monograp series*, 1:1-132.
- Almeida Dias E.R., Woiciechowski E., 1994. Ocorrência de *Phagicola longus* (Trematoda: Heterophyidae) em mugilídeos e no homem em registro e Cananéia, SP. *Hig. Alim.*, 8:43-46.
- Anderson R.C., 2000. Nematode parasites of vertebrates. Their development and transmission, 2nd edition. CABI Publishing, Wallingford.
- Angelucci G., Meloni M., Merella P., Sardu F., Madeddu S., Marrosu R., Petza F., Salati F., 2011. Prevalence of *Anisakis* spp. and *Hysterothylacium* spp. larvae in teleosts and cephalopods sampled from waters off Sardinia. *J. Food protect.*, 74: 1769-1775.
- Anh, N.T.L., Phuong, N.T., Johansen, M.V., et al., 2009. Prevalence and risks for fishborne zoonotic trematode infections in domestic animals in a highly endemic area of North Vietnam. *Acta Trop.* 112: 198-203.
- Anon, 1998. Food Safety Opinion of the Scientific Committee on Veterinary Measures relating to Public Health - Allergic reactions to ingested *Anisakis simplex* antigens and evaluation of the possible risk to human health - 27 April 1998
- Antunes S.A., Almeida Dias E.R., 1994. *Phagicola longus* (Trematoda: Heterophyidae) em mugilídeos estocados resfriados e seu consumo cru em Sao Paulo, SP. *Hig. Alim*, 8(31): 41-42.
- Arru E., 1994. Uccelli ittiofagi, i cormorani. *Civiltà del mare*. Anno V, 6:5-7
- Asada J., 1928. Studies on human trematodes of the genus *Heterophyes* occurring in Japan I. Determination of the first intermediate host of *Heterophyes heterophyes*. *Tokyo med. News* 2564: 6-12.
- Asada J., 1934. On the *Metagonimus yokogawai* and its related species. *Clinical Medicine*, 22: 43-56.
- Audicana L., Audicana M.T., de Corres L.F., Kennedy M.W., 1997. Cooking and freezing may not protect against allergenic reactions to ingested *Anisakis simplex* antigens in humans. *Vet. Rec.*, 140: 235
- Audicana M.T., Ansotegui I.J., de Corres L.F., Kenendy M.W., 2002. *Anisakis simplex*: dangerous-dead or alive?. *Trends Parasitol.*, 18: 20-25.
- Balozet L., Callot J., 1939. Trematodes de Tunisie, III, Superfamille Heterophyoidea. *Arch. Inst. Pasteur Tunis*, 28: 34-63.
- Barlett C.M., 1996. Morphogenesis of *Contracaecum rudolphii* (Nematode: Ascaridoidea), a parasite of fish-eating birds, in its copepod precursor and fish intermediate host. *Parasite*, 4: 367-376.
- Barus V., Sergeeva T.P., Sonin M.D., Ryzhikov K.M., 1978. Helminths of fish-eating birds of the Palearctic region. I. *Nem. Ac.*, Prague, 318.

- Bauchot M.L., 1987. Poissons osseux. In: W. Fischer, M.-L. Bauchot e M. Schneider (Eds.), Fiches FAO d'identification des espèces pour les besoins de la pêche. (Révision 1). Méditerranée et Mer Noire. Zone de pêche 37. Vol. II. Vertébrés. FAO, Roma, 891-1422.
- Beldose GE., Oria MP., 2001. Potential hazards in coldsmoked fish: parasites. *J. Food Sc.*, 66(7), Suppl, 1100-1103.
- Berland B. 1961. Nematodes from some Norwegian marine fishes. *Sarsia* 2: 1-50.
- Berland B., 1964. *Phocasaris cystophorae* sp. nov. (Nematoda) from the hooded seal, with an emendation of the genus. *Arbok for Universitetet i Bergen Series Matematica Rerumque Naturalium* 17, 1-21.
- Bianchi C.N., 2007. Biodiversity issues for the forthcoming tropical Mediterranean Sea. *Hydrobiologia*, 580, 7-21.
- Boireau P., Guillot J., Polack B., Vallée I., Cgermette R., 2002. Risques parasitaires liés aux aliments d'origine animale. *Revue Francaise des Laboratoires*, 348: 84-87.
- Bowles J., Hope M., Tiu W.U., Liu S.X., McManus D.P., 1993. Nuclear and mitochondrial genetic markers highly conserved between Chinese and Philippine *Schistosoma japonicum*. *Acta Trop.* 55(4):217-29.
- Briguglio P., De Lucia A., Ruiu A., 2010. Valutazione del contenuto stomacale di Cormorani (*Phalacrocorax carbo sinensis*) abbattuti nel Febbraio 2009 negli stagni della provincia di Oristano.
- Brogliola A., Kapel, C., 2011. Changing dietary habits in a changing world: emerging drivers for the transmission of foodborne parasitic zoonoses. *Vet. Parasitol.*, 182: 2-13.
- Bullini L., Nascetti G., Paggi L., Orecchia P., Mattiucci S., Berland B., 1986. Genetic variation of ascaridoid worms with different life cycles. *Evolution*, 40: 437-440.
- Bullini L., Arduino P., Cianchi R., Nascetti G., D'amelio S., Mattiucci S., Paggi L., Orecchia P., Plotz J., Smith J.H., Bratney J., 1997. Genetic and ecological research on Anisakid endoparasites of fish and marine mammals in the Antarctic and Arctic-Boreal regions. *Antar. Comm.: Species, Structure and Survival*. Edited by Battaglia, Valencia and Walton: 39-44.
- Burton P.R., 1958. A review of the taxonomy of the trematode genera *Ascocotyle* (Looss) and *Phagicola* (Faust) of the family Heterophyidae. *Proc. Helm. Soc. Wash.*, 25: 117-122.
- Bush A.O., Lafferty K.D., Lotz J.M., Shostak A.W., 1997. Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited. *J. Parasitol.*, 83: 575-583.
- Cancrini G., Magro G., Giannone G., 1997. Primo caso di anisakiasi extra-gastrointestinale nell'uomo diagnosticato in Italia. *Parassitologia*, 39: 13-17.
- Carlos A.M., dos Santos L., Howgate P., 2011. Fishborne zoonotic parasites and aquaculture: A review. *Aquaculture*, 318: 253-261.
- Carpegna M., Grussu M., Grieco F., Veronesi E., Volponi S., 1997. The Italian breeding population of Cormorants *Phalacrocorax carbo*. *Supplemento Ricerche Biologia Selvaggina*, 26: 81-87.
- Casu M., Rivera-Ingram G., Cossu P., Lai T., Sanna D., Dedola G.L., Sussarellu R., Sella G., Cristo B., Curini-Galletti M., García-Gómez J.C., Espinosa F., 2011. Patterns of spatial genetic structuring in the endangered limpet *Patella ferruginea*: implications for the conservation of a Mediterranean endemic. *Genetica*, 139: 1293-1308.
- Cau A., Addis P., Chessa G., Dessole G., Satta L., Deiana A.M. 1991. Preliminary investigation into the feeding habitus of the Cormorant *Phalacrocorax carbo sinensis*. *Oebalia*, 17.
- Cavallero S., D'amelio S., 2012. Occurrence of anisakid nematodes in commercially important fishes from markets in central Italy. *Atti XXVII Congresso Nazionale SOIPA*. Alghero (Italy) 26-29 Giugno 2012. *Mappe Parassitologiche*, 18: 174
- Cavallero S., Ligas A., Bruschi F., D'Amelio S., 2012. Molecular identification of *Anisakis* spp. from fishes collected in the Tyrrhenian Sea (NW Mediterranean). *Vet. Parasitol.*, 187, 563-566.
- Centers for Disease Control and Prevention, sito web www.cdc.gov.

- Chai J.Y., Seo B.S., Lee S.H. 1984. Studies on intestinal trematodes in Korea XI. Two cases of Human infection by *Heterophyes heterophyes* nocens. Korean J. Parasitol., 22(1): 37-42.
- Chai J.Y., Seo B.S., Lee S.H., Hong S.J., Sohn W.M., 1986. Human infections by *Heterophyes heterophyes* and *H. dispar* imported from Saudi Arabia. Korean J. Parasitol., 24: 82–88.
- Chai J.Y., Lee S.H., 1990. Intestinal trematodes of humans in Korea: *Metagonimus*, heterophyids and echinostomes. Korean J Parasitol. 28: 103–22.
- Chai J.Y., Lee S.H., 2002. Food-borne intestinal trematode infections in the Republic of Korea. Parasitol. Int., 51: 129–154.
- Chai J.Y., Murrell K.D., Lymbery A.J., 2005. Fish-borne parasitic zoonoses: Status and issues. Int. J. Parasitol., 35: 1233-1254.
- Chai J.Y., Shin E.H., Lee S.H., Rim H.J., 2009. Foodborne intestinal flukes in Southeast Asia. Kor. J. Parasitol., 47: S69-S102.
- Chaligiannis I., Lalle M., Pozio E., Sotiraki S., 2012. Anisakidae infection in fish of the Aegean Sea. Vet. Parasitol., 184: 362-366.
- Chauvet C., 1988. Manuel sur l'aménagement des peches dans lagunes cotieres: la bordigue mediterrannée. FAO Doc. Tech. Peches, 290.
- Chi J.G., Kim C.W., Kim J.R., Hong S.T., Lee S.H., 1988. Intestinal pathology in human metagonimiasis with ultrastructural observations of parasites. J. Korean Med Sci, 3: 171-177.
- Chieffi P.P., Leite O.H., Dias R.M., Torres D.M. Mangini A.C., 1990. Human parasitism by *Phagicola* sp (Trematoda, Heterophyidae) in Cananeia, Sao Paulo state, Brazil. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo, 32 (4): 285-288.
- Chieffi P.P., Gorla M.C.O., Torres D.M.A.G.V., Dias R.M.D.S., Mangini A.C.S., Monteiro A.V., Woiciechowski E., 1992. Human infection by *Phagicola* sp. (Trematoda, Heterophyidae) in the municipality of Registro, São Paulo State, Brazil. J. Trop. Med. Hyg., 95: 346–348.
- Circolare n. 1/97 della Regione Liguria del 24 marzo 1997.
- Circolare n. 10 del 11 marzo 1992 "Direttive e raccomandazioni in merito alla presenza di larve di Anisakis nel pesce".
- Collomb H., Deschiens R., Damarchi J., 1960. Sur deux cas de distomatose cérébrale a *Heterophyes heterophyes*. Bull. Soc. Path. Exot., 53: 144-147.
- Costa A., Sciortino S., Reale S., Alio V., Cusimano M., Caracappa S., 2008. Indagine sulla presenza di nematodi anisakidae in specie ittiche marine. Atti X congresso Si.D.L.V. Alghero (Italy) 22-24 ottobre 2008, 30.
- Croci L., De Medici D., Fiore A., 2001. Virus enterici veicolati da alimenti. In: De Felip G. (Ed.), Recenti sviluppi di Igiene e Microbiologia degli Alimenti. Roma. Tecniche Nuove, Milano, p. 487-514.
- Culurgioni J., D'amico V., Figus V. 2007. Metacercariae of *Galactosomum lacteum* (Jagerskiold, 1896) Loos, 1899 (Heterophyidae) from marine teleosts in the Gulf of Cagliari (southern Sardinia, Italy). J. Helminthol. 81: 409-413.
- Culurgioni J., De Murtas R., Cannella S., Figus V., 2010b. Parasites of wild European sea bass *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758) from St. Gilla lagoon (Sardinia, South western Mediterranean). Ittiopatologia, 7: 123-133.
- Culurgioni J., De Murtas R., Figus V., 2010a. Helminth parasites of European eel *Anguilla anguilla* L. from St. Gilla lagoon (Sardinia, South western Mediterranean). Ittiopatologia,, 7: 97-106 97.
- Culurgioni J., Sabatini A., De Murtas R., Mattiucci S., Figus V., 2013. Helminth parasites of fish and shellfish from the Santa Gilla Lagoon in southern Sardinia, Italy. J. Helminthol., 10.
- D'Amelio S., Nascetti G., Mattiucci S., Cianchi R., Orecchia P., Paggi L., Berland B., Bullini L., 1990. Ricerche elettroforetiche su alcune specie del genere *Contracaecum*, parassiti di uccelli ittiofagi (Ascaridida: Anisakidae). Parassitologia, 32: 77.

- D'Amelio S., Mathiopoulos K.D., Brandonisio O., Lucarelli G., Doronzo F., Paggi L., 1999. Diagnosis of a case of gastric anisakidosis by PCR-based restriction fragment length polymorphism analysis. *Parassitologia*, 41: 591-593.
- D'Amelio S., Mathiopoulos K.D., Santos C.P., Pugachev O.N., Webb S.C., Picanco M.O., Paggi L., 2000. Genetic markers in ribosomal DNA for the identification of members of the genus *Anisakis* (Nematoda: Ascarioidea) defined by polymerase chain reaction-based restriction fragment length polymorphism. *Int. J. Parasitol.*, 30: 223-226.
- D'Amelio S. et al. 2005. Molecular genotyping of anisakid nematodes from cetaceans of Florida waters. *European Cetacean Society Annual Conference*, Cetacean Social Organization. La Rochelle (France) 2-7 Aprile 32.
- D'Amelio S., Barros N.B., Ingrosso S., Fauquier D.A., Russo R., Paggi L., 2007. Genetic characterization of members of the genus *Contracaecum* (Nematoda: Anisakidae) from fish-eating birds from west-central Florida, USA, with evidence of new species. *Parasitology*, 134: 1041-51.
- D'Amelio S., Busi M., Ingrosso S., Paggi L., Giuffra E., 2010. *Anisakis*. In: Liu DY (ed) *Molecular detection of foodborne pathogens*. CRC, Boca Raton, pp 757-768.
- D'Amelio S., Cavallero S., Dronen N.O., Barros N.B., Paggi L., 2012. Two new species of *Contracaecum* Railliet e Henry, 1912 (Nematoda: Anisakidae), *C. fagerholmi* n. sp. and *C. rudolphii* F from the brown pelican *Pelecanus occidentalis* in the northern Gulf of Mexico. *Syst. Parasitol.*, 81:1-16.
- D'Amelio S., Cavallero S., Busi M., Ingrosso S., Giuffra E., Farjallah S., Costa G., 2013. *Anisakis*. In: Liu D. (Ed.), *Molecular detection of human parasitic pathogens*. CRC Press Taylor & Francis Group. Boca Raton Florida p. 487- 498.
- Daschner A., Cuellar C., Rodero M., 2011. The *Anisakis* allergy debate: does an evolutionary approach help? *Trend Parasitol.*, 28:9-15
- De Angelis C., 1952. Osservazioni su alcuni stagni della Sardegna. *Boll. Pesca Piscic. Idrobiol.* 7: 207-244.
- Decreto del Presidente della Repubblica dell' 8 febbraio 1954, n. 320. Regolamento di Polizia Veterinaria. Suppl. G.U. n. 142 del 24-06-1954. Testo aggiornato a dicembre 2006.
- Decreto Legislativo del 30 Dicembre 1992, n. 531 "Attuazione della direttiva 493/91 CEE, che stabilisce le norme sanitarie applicabili alla produzione e alla commercializzazione dei prodotti della pesca".
- Deiana S., 1961. Phagocola italica ed Heterophyes heterophyes parassiti del cane in Sardegna. *Riv. Parassitol.*, 22: 185-192.
- Deljamure S.L., 1955. Helmintho fauna of marine mammals (Ecology and Phylogeny), Ed. Skrjabin, Academy of Sciences U.S.S.R. National Technical Information Service, U.S. Department of Commerce, Springfield
- Dorny P., Praet N., Deckers N., Gabriel S., 2009. Emerging food-borne parasites. *Vet. Parasitol.*, 163: 196-206.
- Dung T.D., De V.N., Waikagul J., Dalsgaard A., Chai J.Y., Sohn W.M., Murrell K.D., 2007. Fishborne zoonotic intestinal trematodes, Vietnam. *Emerg. Infect. Dis.*, 13: 1828-1833.
- Dziekonska- Rynko J., Rokicki J., 2007. Life cycle of the nematode *Contracaecum rudolphii* Hartwig, 1964 (*sensu lato*) from northern Poland under laboratory condition. *Helminthologia*, 44, 3: 95-102.
- Dzikowski R., Levy M.G., 2013. Heterophyidae. In: *Molecular Detection Of Human Parasitic Pathogens*. Taylor & Francis Group, 403-422.
- EFSA, European Food Safety Authority, 2010. Scientific Opinion on risk assessment of parasites in fishery products. Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). Parma, Italy. *EFSA Journal* 2010; 8(4):1543.

- El-Dakhly Kh.M., El-Nahass E., Uni S., Tuji H., Sakai H., Yanai T., 2012. Levels of infection of gastric nematodes in a flock of great cormorants (*Phalacrocorax carbo*) from Lake Biwa, Japan. *J. Helminthol.*, 86,: 54-63.
- Elsheikha H.M., 2007. Heterophyosis: Risk of ectopic infection. *Vet. Parasitol.*, 147: 341–342.
- Elsheikha H.M., Elshazly A.M., 2008a. Host-dependent variations in the seasonal prevalence and intensity of heterophyid encysted metacercariae (Digenea: Heterophyidea) in brackish water fish in Egypt. *Vet. Parasitol.*, 153 (1-2), 65-72.
- Elsheikha H.M., Elshazly A.M., 2008b. Preliminary observation on infection of brackish and fresh water fish by heterophyid encysted metacercariae in Egypt. *Parasitol res*, 103: 971-977.
- El-Zawawy L.A., 2008. Impact of several control measures on the encysted metacercariae of heterophyids. *J. of the Egyptian Society of Parasitology*, 38 (3): 945-956.
- Euzeby J., 1961. Les maladies vermineuses des animaux domestiques et leurs incidences sur la pathologie humaine. I° Tome. Maladies dues aux namathelminthes. I° Fascicule 1-25. Vigot Frères.
- Euzéby J., 1975. Les maladies vermineuses des animaux domestiques et leur incidences sur la pathologie humaine. Tome II, Maladies dues aux plethelminthes, Troisième fascicule: Trématodes. Éd. Vigot Frères, Paris.
- Fagerholm H.P., Gibson D.I., 1987. A redescription of the pinniped parasite *Contracaecum ogmorhini* (Nematoda, Ascaroidea), with an assesment of its antiboreal circumpolar distribution. *Zool. Scr.*, 16: 19-24.
- Fahmy M.A.M., Selim M.K., 1959. Studies on some trematode parasites of dogs in Egypt with special reference to the role played by fish in their transmission. *Parasitol. Res.*, 19: 3-13.
- FAO, 2010. The state of World Fisheries and Aquaculture 2010. Food And Agriculture Organization of The United Nations, Rome, Italy.
- Farjallah S., Slimane B., Blel H., Amor N., Said K., 2006. Anisakid parasites of two forkbeards (*Phycis blennoides* and *Phycis phycis*) from the eastern Mediterranean coasts in Tunisia. *Parasitol. Res.* 100: 11-17.
- Farjallah S., Avellino P., Di Giulio E., Farina C., Milione M., Cipriani P., Modiano D., D'amelio S., 2007. Diagnosis of a case of oesophageal anisakidosis by PCR-based restriction fragment length polymorphism analysis. *Parassitologia*, 49: 217.
- Farjallah S., Slimane B., Busi M., Paggi L., Amor N., Blel H., Said K., D'amelio S., 2008a. Occurrence and molecular identification of *Anisakis* spp. from the North African coasts of Mediterranean Sea. *Parasitol. Res.* 102: 371-379.
- Farjallah S., Busi M., Mahjoub M. O., Slimane B.B., Paggi L., Said K., D'amelio S., 2008b. Molecular characterization of larval anisakid nematodes from marine fishes off the Moroccan and Mauritanian coasts. *Parasitol. Int.* 57: 430-436.
- Farjallah S., Merella P., Ingrosso S., Rotta A., Slimane B.B., Garippa G., Said K., Busi M., 2008c. Molecular evidence for the occurrence of *Contracaecum rudolphii* A (Nematoda: Anisakidae) in shag *Phalacrocorax aristotelis* (Linnaeus) (Aves: Phalacrocoracidae) from Sardinia (western Mediterranean Sea). *Parasitol. Int.*, 57:437-40.
- Farrugio H., 1977. Clés commentées pou la détermination des adultes et des alevines de Mugilidae de Tunisie. *Cybiurn* 2: 57-73.
- Fioravanti M.L., Restani R., 2003. Zoonosi parassitarie di origine ittica ".in: *Parassitologia Urbana*, a cura di Puccini V. Tarsitano E. *Il Sole 24 ore*
- Fioravanti M.L., Caffara M., Gustinelli A., Scaturro G., Pavoletti E., Saracca L., Di Donfrancesco B., Prearo M., 2012. A survey aimed at mapping the "*Anisakis* risk" in anchovies (*Engraulis encrasicolus*) and sardines (*Sardina pilchardus*) caught off the Ligurian and north-western Adriatic coasts. *Atti XXVII Congresso Nazionale SOIPA. Alghero (Italy) 26-29 Giugno 2012. Mapped Parassitologiche* 18: 182-183.
- Food and Drug Administration, 1984. Parasitic animals in food. In: *Bacteriological analytical manual 6th ed.*, Association of Official Analytical Chemists, Arlington, Virginia, 21.01-21.09.

- Fried B., Huffman J.E., 2008. Helminthic Diseases: Foodborne Trematode Infections. Int. Encicl. of Public Health, 327-332.
- Fried B., Graczyk T.K., Tamang L., 2004. Food-borne intestinal trematodiasis in humans. Parasitol. Res., 93:159-170.
- Gallais P., Paillas C., Luigi D.M., Demarchi J., Deschiens R., 1956. Etude anatomopathologique d'un kyste parasitaire cérébral observé chez l'homme. Bull. Soc. Path. Exot., 48: 830-832.
- García L.S., Brukner D.A., 1997. Diagnostic Medical Parasitology. 3rd ed. Washington, D.C.: ASM Press.
- Garippa G., Arru E., Biddau M., Bazzoni G., 1996. Parasites of cormorants (*Phalacrocorax carbo sinensis*). Parassitologia, 38, 36.,
- Gomaa T., 1962. Pulmonary complications of Heterophyes infestation. J. Egypt. Med. Ass., 45(3): 317-322.
- Griglio B., Marro S., Marotta V., Testa A., Sattanino G., Civera T., Fazio G., Negro M., Cravero M., 2012. Anisakidae: valutazione del rischio e indicazioni operative per i controlli ufficiali alla luce de quadro normativo AIVEMP newsletter 2012 "La Professione Veterinaria" Anno 9, 40: 7-20
- Guindon S., Gascuel O., 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. Syst. Biol. 52: 696-704.
- Gutiérrez-Galindo J.F., Osanz-Mur A.C., Mora-Ventura M.T., 2010. Occurrence and infection dynamics of anisakid larvae in *Scomber scombrus*, *Trachurus trachurus*, *Sardina pilchardus*, and *Engraulis encrasicolus* from Tarragona (NE Spain). Food Contr. 21: 1550-1555.
- Hall T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series. 41: 95-98.
- Hamed M. G. E., Elias A. N. 1970. Effect of food-processing methods upon survival of the trematode *Heterophyes* sp. in flesh of mullet caught from brackish Egyptian waters. J. Food Sei., 35 : 386-8.
- Hartwich G., 1974. Keys to genera of the Ascaridoidea. In: Anderson, R.C., Chabaud, A.G. Wilmott, S. (Eds.), CIH Keys to the nematode parasites of vertebrates. Farnham Royal, Commonwealth Agricul.l Bureau, Richmond, p. 153.
- Heejeong Y., 2009. Review of Zoonotic Parasites in Medical and Veterinary Fields in the Republic of Korea. Korean J Parasitol. 47: 133-141.
- Hills D., Bull M.J.J., 1993. An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. Syst. Biol. 42: 182-192.
- Hu M., D'Amelio S., Zhu X.Q., Paggi L., Gasser R.B., 2001. Mutation scanning for sequence variation in three mitochondrial DNA regions for members of the *Contraecum osculatum* (Nematoda: Ascaridoidea) complex. Electrophoresis, 22:1069-1075.
- Huizinga H.W., 1966. Studies on the life cycle and development of *Contraecum spiculigerum* (Rudolphi, 1809) (Ascaroidea: Heterocheilidae) from marine piscivorous birds. J. Elisha Mitchell Sci. Soc. 82: 181-195.
- Iglesias R., D'Amelio S., Ingrosso S., Farjallah S., Martínez-Cedeira J. A., García-Estévez, J. M., 2008. Molecular and morphological evidence for the occurrence of *Anisakis* sp. A (Nematoda, Anisakidae) in the Blainville's beaked whale *Mesoplodon densirostris*. J. Helminthol., 82: 305-308.
- Ishii Y., Fujino T., Weerasooriya M.V., 1989. Morphology of anisakine larva, 18-29. In: H Ishikura e K Kikuchi (eds), Gastric Anisakiasis in Japan. Epidemiology, Diagnosis, Treatment, Springer-Verlag, Tokyo.
- Ishikura H, Kikuchi K., Nagasawa K., Ooiwa T., Takamiya H., Sato N., Sugane K., 1993. Anisakidae and Anisakidosis. Prog. Clin. Parasitol., 43:102.
- Ishikura H., 2003. Anisakiasis (2) Clinical pathology and epidemiology. In 'Progress of Medical Parasitology in Japan'. Vol. 8. (Eds S Otsuru, S Kamegai, S Hayashi.) pp. 451-473. (Meguro Parasitological Museum: Tokyo).

- Kagei N., Hayashi S., Kato K., 1980. On the heterophyid trematode (*Heterophyes heterophyes*) infection cases imported from Egypt to Japan. *Jpn. J. Trop. Med. Hyg.*, 8: 1-7.
- Kalay M., Donmez A.E., Koyuncu C.E., Genc E., Sahin G., 2009. Seasonal variation of *Hysterothylacium aduncum* (Nematoda: Raphidascarididae) infestation in sparid fishes in the Northeast Mediterranean Sea. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 33, 517-523.
- Kanarek G., 2011. Population biology of *Contracaecum rudolphii sensu lato* (Nematoda) in the great cormorant (*Phalacrocorax carbo*) from northeastern Poland. *J Parasitol.*, 97:185-91.
- Kanarek G., Bohdanowicz J., 2009. Larval *Contracaecum* sp. (Nematoda: Anisakidae) in the Great Cormorant [*Phalacrocorax carbo* (L., 1758)] from north-eastern Poland: a morphological and morphometric analysis. *Vet Parasitol.* 3; 166:90-7.
- Kasuya S., Hamano H., Hizumi S., 1990. Mackerel induced urticaria and *Anisakis*. *Lancet*, 335:665.
- Khalafalla R.E., 2011. A survey study on gastrointestinal parasites of stray cats in Northern Region of Nile Delta, Egypt. *Plos one* 6: e20283.
- Khalil M., 1933. The life history of the human trematode parasite *Heterophyes heterophyes* in Egypt. *The Lancet*, 225: 537.
- Kijewska A., Dzido J., Shukhgalter O., Rokicki J., 2009. Anisakid parasites of fishes caught on the African shelf. *J. Parasitol.*, 95: 639-645.
- Kino H., Oishi H., Ohno Y., Ishiguro M., 2002. An endemic human infection with *Heterophyes nocens* Onji Et Nishio 1916 at Mikkabi-Cho, Shizuoka, Japan. *Jpn. J. Trop. Med. Hyg.*, Vol. 30, No. 3,, Pp. 301-304.
- Kino H., Suzuki T., Oishi H., Suzuki S., Yamagiwa S., Ishiguro M., 2006. Geographical distribution of *Metagonimus yokogawai* and *M. miyatai* in Shizuoka Prefecture, Japan, and their site preferences in the sweetfish, *Plecoglossus altivelis*, and hamsters. *Parasitol. Int.*, 55: 201–206.
- Klimpel S, Palm H.W., Rückert S, Piatkowski U., 2004. The life cycle of *Anisakis simplex* in the Norwegian Deep (northern North Sea). *Parasitol. Res.*, 94:1-9.
- Ko R.C., 2006. Fish-borne parasitic zoonoses. In: Woo, P.T.K. (ed), *Fish Diseases and Disorders*, Vol. 1, CAB Int, Cambridge, MA. 592-628.
- Kreis H.A., 1955. *Contracaecum septentrionale*, ein neuer parasit aus dem kormoran; sein lebenslauf, sowie angaben uber die entwicklung der Anisakinae. *Zoologische fur Parasitenkunden* 17, 10-121.
- Lane C. (1922). A note on *Heterophyes nocens* as a distinct species of trematode parasite. *Lancet*, 203,505.
- Legge 30 aprile 1962, n. 283 "Modifica degli articoli 242, 243, 247, 250 e 262 del testo unico delle leggi sanitarie, approvato con regio decreto 27 luglio 1934, n. 1265: Disciplina igienica della produzione e della vendita delle sostanze alimentari e delle bevande".
- Leiper T. (1922). A helminthological review. *Tropical Diseases Bulletin*, 20: 364-365.
- Li A., D'amelio S., Paggi L., He F., Gasser R.B., Lun Z.R., Abollo E., Turchetto M., Zhu X.Q., 2005. Genetic evidence for the existence of sibling species within *Contracaecum rudolphii* (Hartwich, 1964) and the validity of *Contracaecum septentrionale* (Kreis, 1955) (Nematoda: Anisakidae). *Parasitol. Res.*, 96: 361-366.
- Lobna S.M.A., Metawea Y.F., Elsheikha H.M., 2010. Prevalence of heterophyiosis in Tilapia fish and humans in Northern Egypt. *Parasitol Res*, 107: 1029-1034.
- Lochi, P.G., 1986. Heteropyidae ed ospiti intermedi in alcuni stagni della Sardegna. Tesi di laurea Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Sassari.
- Lymbery A.J., Doupé R.G., Munshi, M.A., Wong, 2002. Larvae of *Contracaecum* sp. among inshore fish species of southwestern Australia. *Dis. Aq. Org.*, 51: 157-159.
- Manfredi M.T., Oneto M., 1997. *Phagicola longa* (Heterophyidae) in dogs from Chile: morphological findings and taxonomical problems. *Parassitologia*, 39:9-11.
- Manfredi M.T., Crosa G., Galli P., Ganduglia S., 2000. Distribution of *Anisakis simplex* in fish caught in the Ligurian Sea. *Parasitol. Res.*, 86: 551-553.

- Marcus S., Maqbool A., Khan N., Iqbal K.J., Ashraf, K., Ahmad N., 2012. Food born parasitic zoonosis with special references to metacercarial infection in fishes. *The Journal of Animal & Plant Sciences*, 22 (3): 619-621.
- Marino G., 2003. Eterofidiosi in Sardegna: una zoonosi misconosciuta. Tesi Scuola di Specializzazione in Ispezione degli Alimenti di Origine Animale, Università degli studi di Sassari, Facoltà di Medicina Veterinaria.
- Martorelli S.R., Lino A., Marcotegui P., Montes M.M., Alda P., Panei C.J., 2012. Morphological and molecular identification of the fish-borne metacercaria of *Ascocotyle (Phagicola) longa* Ransom, 1920 in *Mugil liza* from Argentina. *Vet. Parasitol.* 6441: 5.
- Mattiucci S., Nascetti G., 2006. Molecular systematics, phylogeny and ecology of anisakid nematodes of the genus *Anisakis* Dujardin, 1845: an update. *Parasite*, 13: 99-113.
- Mattiucci S., Nascetti G., 2007. Genetic diversity and infection levels of anisakid nematode parasites of aquatic organisms of Boreal and Austral regions. *Vet. Parasitol.*, 148: 43-57.
- Mattiucci S., Nascetti G., 2008. Advances and trends in the molecular systematics of anisakid nematodes, with implication for their evolutionary ecology and host-parasite co-evolutionary processes. *Adv. Parasitol.*, 66: 47-147.
- Mattiucci S., Nascetti G., Cianchi R., Paggi L., Arduino P., Margolis L., Bratney J., Webb S.C., D'Amelio S., Orecchia P., Bullini L., 1997. Genetic and ecological data on the *Anisakis simplex* complex with evidence for a new species (Nematoda, Ascaridoidea, Anisakidae). *J. Parasitol.*, 83: 401-416.
- Mattiucci S., Paggi L., Nascetti G., Ishikura H., Kikuchi K., Sato N., Cianchi R., Bullini L., 1998. Allozyme and morphological identification of *Anisakis*, *Contracaecum* and *Pseudoterranova* from Japanese waters (Nematoda: Ascaridoidea). *Syst. Parasitol.*, 40: 81-92.
- Mattiucci S., Paggi L., Nascetti G., Abollo E., Webb S.C., Pascual S., Cianchi R., Bullini L., 2001. Genetic divergence and reproductive isolation between *Anisakis brevispiculata* and *Anisakis physeteris* (Nematoda: Anisakidae). *Int. J. Parasitol.*, 31: 9-14.
- Mattiucci S., Paggi L., Nascetti G., Portes Santos C., Costa G., 2002a. Genetic markers in the study of *Anisakis typica* (Diesing, 1860): larval identification and genetic relationships with other species of *Anisakis* Dujardin, 1845 (Nematoda: Anisakidae). *Syst. Parasitol.*, 51: 159-170
- Mattiucci S., Turchetto M., Brigantini F., Nascetti G., 2002b. On the occurrence of the sibling species of *Contracaecum rudolphii* complex (Nematoda: Anisakidae) in cormorants (*Phalacrocorax carbo sinensis*) from Venice and Caorle lagoons: genetic markers and ecological studies. *Parassitologia*, 44: 105.
- Mattiucci S., Cianchi R., Nascetti G., Paggi L., Sardella N., Timi J., Webb S.C., Bastida R., Rodriguez D., Bullini L., 2003. Genetic evidence for two sibling species within *Contracaecum ogmorhini* Johnston e Mawson (1941) (Nematoda: Anisakidae) from otariid seals of boreal and austral regions. *Syst. Parasitol.*, 54: 13-23.
- Mattiucci S., Abaunza P., Ramadori L., Nascetti G., 2004. Genetic identification of *Anisakis* larvae in European hake from Atlantic and Mediterranean waters for stock recognition. *J. Fish Biol.*, 65: 495-510.
- Mattiucci S., Nascetti G., Dailey M., Webb S.C., Barros N., Cianchi R., Bullini L., 2005. Evidence for a new species of *Anisakis* Dujardin, 1845: morphological description and genetic relationships between congeners (Nematoda: Anisakidae). *Syst. Parasitol.*, 61: 157-171.
- Mattiucci S., Abaunza P., Damiano S., Garcia A., Santos, M.N., Nascetti, G., 2007a. Distribution of *Anisakis* larvae identified by genetic markers and their use for stock characterization of demersal and pelagic fish from European waters: an update. *J. Helminthol.*, 81: 117-127.
- Mattiucci S., Paoletti M., De Angelis M., Sereno S., Cancrini G., 2007b. Human Anisakidosis in Italy: molecular and histological identification of two new cases. *Parassitologia.*, 49: 226.
- Mattiucci S., Paoletti M., Webb S.C., Sardella N., Timi J.T., Berland B., Nascetti G., 2008a. Genetic relationships among species of *Contracaecum* Railliet e Henry, 1912 and *Phocascaris* Höst, 1932

- (Nematoda: Anisakidae) from pinnipeds inferred from mitochondrial *Cox2* sequences, and congruence with allozyme data. *Parasite*, 15: 408-419
- Mattiucci S., Paoletti M., Olivero-Verbel J., Baldiris R., Arroyo-Salgado B., Garbin L., Navone G., Nascetti G., 2008b. *Contraecum bioccai* n. sp. from the brown pelican *Pelecanus occidentalis* (L.) in Colombia (Nematoda: Anisakidae): morphology, molecular evidence and its genetic relationship with congeners from fish-eating birds. *Syst Parasitol.*, 69:101-21.
- Mattiucci S., Paoletti M., Webb S.C., 2009. *Anisakis nascettii* n. sp. (Nematoda: Anisakidae) from beaked whales of the southern hemisphere: morphological description, genetic relationships between congeners and ecological data. *Syst. Parasitol.*, 74: 199-217.
- Mattiucci S., Paoletti M., Borrini F., Palumbo M., Palmieri R.M., Gomes V., Casati A., Nascetti G., 2011. First molecular identification of the zoonotic parasite *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae) in a paraffin-embedded granuloma taken from a case of human intestinal anisakiasis in Italy. *BMC Infect. Dis.*, 31: 11-82.
- Mattiucci S., Fazii P., De Rosa A., Paoletti M., Megna A.S., Glielmo A., De Angelis M., Costa A., Meucci C., Calvaruso V., Sorrentini I, Palma G., Bruschi F., Nascetti G., 2013. Anisakiasis and Gastroallergic Reactions Associated with *Anisakis pegreffii* Infection, Italy. *Emerg. Infect. Dis.*, 19: 496-499.
- McCarthy J., Moore, T.A., 2000. Emerging helminth zoonoses. *Int. J. Parasitol.*, 30, 1351–1360.
- Meloni M., Angelucci G., Merella P., Siddi R., Deiana, C., Orru G., Salati F., 2011. Molecular characterization of *Anisakis* larvae from fish caught off Sardinia. *J. Parasitol.*, 97: 908-914.
- Merella P., 2000. Per le peschiere degli Stagni del Sinis. *Civiltà del Mare*, 11: 4-6.
- Merella P., Garippa G., 2001. Metazoan parasites of grey mullets (Teleostea: Mugilidae) from the Mistras Lagoon (Sardinia, westernMediterranean). *Sci. Mar.*, 65: 201-206.
- Merella P., Marino G., Garippa G., 2004. Heterophyid metacercariae (Trematoda: Heterophyidae) in grey mullets (Osteichthyes: Mugilidae) from the Cabras and Mistras lagoons (Sardinia, western Mediterranean). *SOIPA XXIII Parassitol.* 46.
- Millot C., Taupier-Letage I., 2005. Circulation in the Mediterranean Sea. *Handb. Environ. Chem.*, 5: 29-66.
- Mimioglu M., Sayin F, 1957. Ankara köpeklerinde tesbit edilen ilk Heterophyes heterophyes stiles re Hassal 1900. *Vak'asi vet. Fac. Dergisi Ankara Univ.*, 4: 1-5.
- Ministero della Salute DGSAN 4379-P-17/02/2011 “Chiarimenti concernenti alcuni aspetti applicativi del regolamento CE 853/2004 in materia di vendita e somministrazione di preparazioni gastronomiche contenenti prodotti della pesca destinati ad essere consumaticrudi o praticamente crudi.
- Ministero della Salute DGSAN 4380-P-17/02/2011 “Articolo 5 legge 283 - Presenza di Anisakis”.
- Mladineo I., Šimat V., Miletić J., Beck R., Poljak V., 2012. Molecular identification and population dynamic of *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae Dujardin, 1845) isolated from the European anchovy (*Engraulis encrasicolus* L.) in the Adriatic Sea. *Int. J. Food Microbiol.*, 157: 224-229.
- Montalto M., Miele L., Marchegiano A., Santoro L., Curigliano V., Vastola M., et al., 2005. *Anisakis* infestation: A case of acute abdomen mimicking Crohn’s disease and eosinophilic gastroenteritis. *Digest. Liver Dis.*, 37: 62–64.
- Moravec F., 2009. Experimental studies on the development of *Contraecum rudolphii* (Nematoda: Anisakidae) in copepod and fish paratenic host. *Folia Parasitol.*, 56 : 185- 193.
- Moschella C.M., Mattiucci S., Mingazzini P., De Angelis G., Assenza M., Lombardo F., Monaco S., Paggi L., Modini C., 2004. Intestinal anisakiasis in Italy: case report. *J. Helminthol.*, 78: 271-273.
- Mozgovoi A., Shakhmatova W.I., Semenov M.K., 1968a. Life cycle of *Contraecum spiculigerum* (Ascaridata: Anisakidae), a parasite of domestic and game birds. *Trudy Gelmintol. Lab.*, 19: 129-136.

- Mozgovoi A.A., Semenova M.K., Shakhmatova V.I., 1968b. Life cycle of *Contracaecum microcephalum* (Ascaridata: Anisakidae), a parasite of fish-eating birds. Papers Onderstepoort J. Vet. Res., 48: 207-213. Olsen, O.W. & E.T. Lyons.
- Muller R., 2001. Worms and Human Disease. Second ed. Cabi publishing, Wallingford.
- Nadler S.A., Hudspeth D.S.S., 2000. Phylogeny of the Ascaridoidea (Nematoda: Ascaridida) based on three genes and morphology: Hypotheses of structural and sequence evolution. J. Parasitol., 86: 380-393.
- Nadler S.A., D'Amelio S., Fagerholm H.P., Berland B., Paggi L., 2000. Phylogenetic relationships among species of *Contracaecum* Railliet e Henry, 1912 and *Phocascaris* host, 1932 (Nematoda: Ascaridoidea) based on nuclear rDNA sequence data. Parasitology, 121, 455-463.
- Nadler S.A., D'Amelio S., Dailey M.D., Paggi L., Siu S., Sakanari J.A., 2005. Molecular phylogenetics and diagnosis of *Anisakis*, *Pseudoterranova*, and *Contracaecum* from northern Pacific marine mammals. J. Parasitol., 91: 1413-1429.
- Nascetti G., Bullini L., Cianchi R., Paggi L., Orecchia P., Mattiucci S., D'Amelio S., Berland B., 1990. Genetic relationships among anisakid species belonging to the genera *Contracaecum* and *Phocascaris*. Bull. Soc. Franc. Parasitol., 8: 261.
- Nascetti G., Cianchi R., Mattiucci S., D'Amelio S., Orecchia P., Paggi L., Bratney J., Berland B., Smith J.W., Bullini L., 1993. Three sibling species within *Contracaecum osculatum* (Nematoda, Ascaridida, Ascaridoidea) from the Atlantic Arctic-boreal region: reproductive isolation and host preferences. Int. J. Parasitol., 23: 105-120.
- Nash C.E., Koningsberger R.M., 1981. Artificial propagation. In: O.H. Oren (Ed.), Aquaculture of grey mullets. Cambridge University Press, Cambridge, 265-312.
- Neveu-Lemaire M., 1936. Traité d'helminthologie médicale et vétérinaire. Éd. Vigot Frères, Paris.
- Nieddu A.M., Lochi P.G., 1988. Heterophyidi e ospiti intermedi in Sardegna. Riv. Parassitol., 5: 261- 267.
- Nota Informativa del Ministero della Salute del 27 febbraio 2008. Oggetto "Emergenza dell'opistorchiasi nell'Italia centrale".
- Olsen O., 1962. Animal parasites: their biology and life cycles. Burger pub. Co., Minneapolis, Minn.
- Onji Y., Nishio T., 1916. On the trematodes whose intermediate host is brackish water fishes. Chiba Igaku Semmon Gakko Zasshi;81-82: 229-49.
- Ordinanza Ministeriale 12 maggio 1992 "Misure urgenti per la prevenzione delle parassitosi da *Anisakis*".
- Orecchia P., Berland B., Paggi L., Nascetti G., Mattiucci S., Bullini L., 1986. Divergenza genetica di specie dei generi *Contracaecum* e *Phocascaris* (Ascaridida, Anisakidae) con diverso ciclo biologico. Ann. Ist. Sup. San., 22: 345-348.
- Orecchia P., Mattiucci S., D'Amelio S., Paggi L., Plotz J., Cianchi R., Nascetti G., Arduino P. Bullini L., 1994. Two new members in the *Contracaecum osculatum* complex (Nematoda, Ascaridoidea) from the Antarctic. Int. J. Parasitol., 24: 367-377.
- P.A.H.O., 2003. Zoonoses And Communicable Diseases Common To Man And Animals. Third Ed; Volume III; Parasitoses.
- Paggi L., Nascetti G., Webb S.C., Mattiucci S., Cianchi R., Bullini L., 1998. A new species of *Anisakis* Dujardin, 1845 (Nematoda, Anisakidae) from beaked whales (Ziphiidae): Allozyme and morphological evidence. Syst. Parasitol., 40: 161-174.
- Pampiglione S., Rivasi F., Criscuolo M., De Benettis A., Gentile A., Russo S., Testini M., Villani M., 2002. Human Anisakiasis in Italy: A Report of Eleven New Cases. Pathol. Res. and Pract., 198: 429-434.
- Paperna I., 1975. Parasites and diseases of the grey mullet (Mugilidae) with special reference to the seas of the Near East. Aquaculture, 5: 65-80.
- Paperna I., Overstreet R.M., 1981. Parasites and Diseases of Mulletts (Mugilidae). Publications from the Harold W. Manter Laboratory of Parasitology. 453-454.

- Pearson J., 2008. Family Heterophyidae Leiper, 1909. In: Bray R.A., Gibson D.I., Jones A. (eds). Keys to the Trematoda. Vol 3 CAB International, Wallingford, U.K., 113-141.
- Penalver, J., Maria Dolores, E., Munoz, P., 2010. Absence of anisakid larvae in farmed European Sea Bass (*Dicentrarchus labrax* L.) and Gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) in Southeast Spain. *J. Food Prot.* 73: 1332–1334.
- Phan V.T., Ersboll A.K., Te B.Q., Hang T.N., Murrell D., Dalsgaard, A., 2010. Fish-borne zoonotic trematodes in cultured and wild-caught freshwater fish from the Red River Delta, Vietnam. *Vector Borne and Zoonotic Diseases.* 10: 861-866.
- Pontes T., D'Amelio S., Costa G., Paggi L., 2005. Molecular characterization of larval anisakid nematodes from marine fishes of Madeira by a PCR-based approach, with evidence for a new species. *J. Parasitol.*, 91: 1430-1434.
- Portes Santos C., Correa Lopes K., da Silva Costa V., Nunes dos Santos E.G., 2013. Fish-borne trematodosis: Potential risk of infection by *Ascocotyle (Phagicola) longa* (Heterophyidae). *Vet Parasitol.*, 193: 302-306.
- Posada D., 2008. jModelTest: phylogenetic model averaging. *Mol. Biol. Evol.*, 25: 1253-1256.
- Pracchi R., Terrosu Asole A., 1971. Atlante della Sardegna. Assessorato all'industria e al commercio della Regione Autonoma della Sardegna, La Zattera, Cagliari, Italy.
- Redd A.J., Stoneking M., 1999. Peopling of Sahul: mtDNA variation in Aboriginal Australian and Papua New Guinean populations. *Am. J. Hum. Genet.*, 65: 808-828.
- Regolamento (CE) n. 1020/2008 della Commissione, del 17 ottobre 2008, che modifica gli allegati II e III del regolamento (CE) n. 853/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio che stabilisce norme specifiche in materia di igiene per gli alimenti di origine animale e il regolamento (CE) n. 2076/2005 per quanto riguarda la marchiatura d'identificazione, il latte crudo e i prodotti lattiero-caseari, le uova e gli ovoprodotti e taluni prodotti della pesca.
- Regolamento (CE) n. 178/2002 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 28 gennaio 2002, che stabilisce i principi e i requisiti generali della legislazione alimentare, istituisce l'Autorità europea per la sicurezza alimentare e fissa procedure nel campo della sicurezza alimentare.
- Regolamento (CE) n. 853/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio del 29 aprile 2004, che stabilisce norme specifiche in materia di igiene per gli alimenti di origine animale
- Regolamento (UE) n. 1276/2011 della Commissione dell'8 dicembre 2011 che modifica l'allegato III del regolamento (CE) n. 853/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio relativamente al trattamento per l'uccisione di parassiti vitali in prodotti della pesca destinati al consumo umano.
- Reiczigel J., Rózsa L., 2005. Quantitative Parasitology 3.0. Budapest. Distributed by the authors (<http://www.zoologia.hu/qp/qp.html>).
- Rello F.J., Adroher F.J., Valero A., 2008. *Hysterothylacium aduncum*, the only anisakid parasite of sardines (*Sardina pilchardus*) from the southern and eastern coasts of Spain. *Parasitol. Res.*, 104: 117-121.
- Rello F.J., Adroher F.J., Benitez R., Valero A., 2009. The fishing area as a possible indicator of the infection by anisakids in anchovies (*Engraulis encrasicolus*) from southwestern Europe. *Int. J. Food Microbiol.*, 129: 277-281.
- Rim H.J., Farag H.F., Sornmani S., Cross J.H., 1994. Foodborne trematodes: ignored or emerging?. *Parasitol. Today*, 10: 207-209.
- Rio M.H., Poulain P.M., Pascual A., Mauri E., Larnicol G., Santoleri R., 2007. A mean dynamic topography of the Mediterranean Sea computed from altimetric data, in situ measurements and a general circulation model. *J. Mar. Syst.*, 65: 484-508.
- Ryang Y.S., Lee C.Y., K.J. Lee, Lee S.H., Chai J.Y., 1999. An incidental case of human *heterophyes nocens* infection diagnosed by sectional morphology in a biopsy specimen of the small intestine. *K. J. Parasitol*, 37: 189-194.
- Salati F., Meloni M., Cau M., Angelucci G., 2013. Presence of *Contracaecum* sp. in teleosts cultured and fished in Sardinia. *Vet. Parasitol.*, 196: 382-387.

- Salmaso S., Tozzi A.E., 2001. Epidemiologia delle tossinfezioni alimentari. In: De Felip G. (Ed.), *Recenti sviluppi di Igiene e Microbiologia degli Alimenti*. Roma. Tecniche Nuove, Milano, p. 41-61
- Sanna D., Cossu P., Dedola G. L., Scarpa F., Maltagliati F., Castelli A., Franzoi P., Lai T., Cristo B., Curini-Galletti M., Francalacci P., Casu M., 2013. Mitochondrial DNA reveals genetic structuring of *Pinna nobilis* across the Mediterranean Sea. *Plos One* 8(6): e67372.
- Scala A., Garippa G., Sanna E., 1991. Heterophidi e mixosporidi nei muggini della laguna del Calich (Alghero - Sassari). *Boll. Soc. It. Patol. Ittica*, 5, 88-91.
- Schaum E., Müller W., 1967. Die Heterocheilidiasis. eine infection des menschen mit larven von fisch-ascariden. *Deutsche Medizinische Wochenschrift*, 92: 2230–2233.
- Scholz T., 1999. Taxonomic study of *Ascocotyle* (*Phagicola*) *longa* Ransom, 1920 (Digenea: Heterophyidae) and related taxa. *Syst. Parasitol.*, 43: 147–158.
- Scholz T., 2001. Trematodes of the family Heterophyidae (Digenea) in Mexico: a review of species and new host and geographical records. *J. Nat. Hist.*, 35: 1733-1772.
- Scholz T., Aguirre-Macedo M.L., 2000. Metacercariae of trematodes parasitizing freshwater fish in Mexico: a reappraisal and methods of study. In: Salgado-Maldonado, G., A.N. García Aldrete and V.M. Vidal-Martinez (Eds.). *Metazoan parasites in the neotropics: a systematic and ecological perspective*. Instituto de Biología, UNAM. México, p. 101-115.
- Scholz T., Vargas-Vázquez J., Aguirre-Macedo L., Vidal-Martinez V.M., 1997. Species of *Ascocotyle* Looss, 1899 (Digenea: Heterophyidae) of the Yucatan Peninsula, Mexico, and notes on their life-cycles. *Systematic Parasitol*, 36: 161-181.
- Shamsi S., Butcher A.R., 2011. First report of human anisakidosis in Australia *Medical Journal of Australia*, 194: 4.
- Simoës S.B., Barbosa H.S., Santos C.P., 2010. The life cycle of *Ascocotyle* (*Phagicola*) *longa* (Digenea: Heterophyidae), a causative agent of fish-borne trematodosis. *Acta Tropica*, 113: 226–233.
- Smith J.W., 1971. *Thysanoessa inermis* and *T. longicaudata* (Euphausiidae) as first intermediate host of *Anisakis* sp. (Nematoda: Ascaridata) in the northern North sea, to the North of Scotland and at Faroe. *Nature*, 234: 478.
- Smith J.W., 1983. *Anisakis simplex* (Rudolphi, 1809, det Krabbe, 1878) (Nematoda: Ascaridoidea): morphology and morphometry of larvae from euphausiids and fish, and a review of the life history and ecology. *J. Helminthol.*, 57: 205-224.
- Sohn W.M., 2009. Fish-borne zoonotic trematode metacercariae in the Republic of Korea. *Kor. J. Parasitol.* Oct; 47: 103-113.
- Sola D, Antonelli S, Federici C., 2011. Descrizione di un caso clinico e considerazioni di ordine igienico-sanitario. *La Professione Veterinaria*, 25: 10.
- Stallone O., Paggi L., Balestrazzi A., Mattiucci S. Montinari M., 1996. Gastric anisakiasis in Italy: case report. *Mediterranean Journal of Surgery and Medicine*, 4: 13–16.
- Suzuki N., Kumazawa H., Araki T., Hara M., Morita H. 1982. Occurrence of *Heterophyes heterophyes nocens* Onji et Nishio, 1916 in man in Kochi Prefecture Japanese. *J. Parasitol* 31: 271-274.
- Szostakowska B., Fagerholm H.P. 2007. Molecular identification of two strains of third-stage larvae of *Contracaecum rudolphii sensu lato* (Nematoda: Anisakidae) from fish in Poland. *J Parasitol.*, 93(4):961-4.
- Szostakowska B, Fagerholm H.P., 2012. Coexistence and genetic variability of *Contracaecum rudolphii* A and *Contracaecum rudolphii* B (Nematoda: Anisakidae) in cormorants, *Phalacrocorax carbo sinensis*, in the Baltic Region. *J. Parasitol.* 98 3, 472-478.
- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S., 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.*, 28: 2731–2739.

- Taraschewski H., 1984. Heterophyasis, an intestinal fluke infection of man and vertebrates transmitted by euryhaline gastropods and fish. *Helgolander Meeresunters*, 37: 463-478.
- Taraschewski H., 1985. Transmission experiments on the host specificity of *Heterophyes* species in 16 potential definitive hosts. *Z. Parasitenkd.*, 71: 505-518.
- Taraschewski H., Nicolaidou A., 1987. *Heterophyes* species in Greece: record of *H. heterophyes*, *H. aequalis* and *H. dispar* from the first intermediate host, *Pirenella conica*. *J. of Helminth.*, 61: 28-32.
- Testini M., Gentile A., Lissidini G., Di Venere B., Pampiglione S., 2003. Splenic anisakiasis resulting from gastric perforation: An unusual occurrence. *Int. Surgery.*, 88: 126-128.
- Thomas L.J. 1937 Further studies on the life cycle of *Contracaecum spiculigerum*. *J. Parasitol.*, 23: 572.
- Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J., 1994. CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, 22: 4673-4680
- Thompson R.C.A., 2000. Emerging parasitic zoonosis. *Int. J. Parasitol.*, 30: 12-13.
- Thu N.D., Dalsgaard A., Loan L.T.T., Murrel K.D., 2007. Survey for zoonotic liver and intestinal trematode metacercariae in cultured and wild fish in An Giang Province, Vietnam. *K. J. Parasitol.*, 45: 45-54.
- Tinar R., 1976. Ankara köpeklerinde iki yeni trematod bulgusu: *Phagicola italica* (Alessandrini, 1906) uc *Echinochasmus perolialis* (Von Ralz, 1908). *Firat Univ. Vel. Fak. Derg.*, 3: 53-61.
- Tortonese E., 1975. Fauna d'Italia, Osteichthyes. Vol. XI. Calderini, Bologna.
- Ugenti I., Lattarulo S., Ferrarese F., De Ceglie A., Manta R., Brandonsio O., 2007. Acute gastric anisakiasis: An Italian experience. *Minerva Chirurgica*, 62: 51-60.
- Umehara A., Kawakami Y., Araki J., Uchida A., 2006. Molecular identification of *Anisakis simplex sensu stricto* and *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae) from fish and cetacean in Japanese waters. *Parasitol. Int.*, 55: 267-271.
- Umehara A., Kawakami Y., Araki J., Uchida A., 2007. Molecular identification of the etiological agent of the human anisakiasis in Japan. *Parasitol. Int.*, 56: 211-215.
- Valentini A., Mattiucci S., Bondanelli P., Webb S.C., Mignucci-Giannone A., Colom-Llavina M., et al., 2006. Genetic relationships among *Anisakis* species (Nematoda: Anisakidae) inferred from mitochondrial cox-2 sequences, and comparison with allozyme data. *J. Parasitol.*, 92: 156-166.
- Valero A., Martin-Sanchez J., Reyes-Muelas E., Adroher F.J., 2000. Larval anisakids parasitizing the blue whiting, *Micromesistius poutassou*, from Motril Bay in the Mediterranean region of southern Spain. *J. Helminthol.*, 74: 361-364.
- Valero A., López-Cuello M., Benítez R., Adroher F.J., 2006a. *Anisakis* spp. in European hake, *Merluccius merluccius* (L.) from the Atlantic off north-west Africa and the Mediterranean off southern Spain. *Acta Parasitol.*, 51: 209-212.
- Valero A., Paniagua M.I., Hierro I., Díaz V., Valderrama M.J., Benitez R., Adroher F.J., 2006b. Anisakid parasites of two forkbeards (*Phycis blennoides* and *Phycis phycis*) from the Mediterranean coasts of Andalucía (Southern Spain). *Parasitol. Int.*, 55: 1-5
- Van Banning P., 1971. Some notes on a successful rearing of the herring-worm, *Anisakis marina* L. (Nematoda: Heterocheilidae). *J. Cons. Int. Explor. Mer.*, 34: 84-88.
- Van Thiel P., 1960 *Anisakis*. *Parasitology*, 53:16.
- Veldkamp R., 1996. Cormorants *Phalacrocorax carbo* in Europe: a first step towards a European management plan. Nat. Forest and Nat. Agency, Denmark, and Nat. Ref. Centre Nat. Manag., The Netherlands. Rapport Bureau Veldkamp, Steenwijk, 93 p.
- Volponi S., 1999. Reproduction of a Newly-established population of the Great Cormorant in Northeastern Italy. *Waterbirds* 22, 2: 263-273.

- Waikagul J., Pearson J.C., 1989. *Heterophyes nocens* Onji e Nishio, 1916 (Digenea: Heterophyidae) from the water rat, *Hydromys chrysogaster* Geoffroy, 1804 in Australia. *Systematic Parasitol*, 13: 53-61.
- Wells W.H., Randall B.H., 1956. New hosts for trematodes of the genus *Heterophyes* in Egypt. *J. Parasit*, 42: 287-292.
- WHO, 2004. Food-Borne Trematode Infections in Asia. 55, WHO, Manila, Phillipines.
- Witenberg G., 1928. Studies on the Trematode-Family Heterophyidae. In: *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. Univ Liverp. Vol. XXIII Number 2.
- World Health Organization, 1995. Control of foodborne trematode infections, WHO Tech. Rep. Ser. No. 849 1995 pp. 1–157.
- Yamaguti S., 1971. Synopsis of digenetic trematodes of vertebrates. Tokyo, Keigaku Publ., Vol.1, pp. 624–625.
- Yu S.H., Mott K.E., 1994. Epidemiology and morbidity of food-borne intestinal trematode infections. *Trop Dis Bull*, 91: R125 –R152.
- Zhu X., D’Amelio S., Hu M., Paggi L., Gasser R. B., 2001. Electrophoretic detection of population variation within *Contraecum ogorhini* (Nematoda: Ascaridoidea: Anisakidae). *Electrophoresis* 22: 1930–1934.
- Zhu X., D’Amelio S., Palm H. W., Paggi L., George-Nascimento M., Gasser R. B., 2002. SSCP-based identification of members within the *Pseudoterranova decipiens* complex (Nematoda: Ascaridoidea: Anisakidae) using genetic markers in the internal transcribed spacers of ribosomal DNA. *Parasitology* 124: 615–623.

RINGRAZIAMENTI

Grazie al mio tutor, Prof. Giovanni Garippa, per i preziosi consigli e l'affetto con cui mi ha supportato in questi anni.

Grazie a Paolo, senza il cui aiuto il lavoro di questa tesi non si sarebbe potuto realizzare. Grazie per la pazienza, gli insegnamenti, per avermi incoraggiato, sostenuto ... per l'incessante lavoro di questi ultimi tre mesi e per le tue fantastiche revisioni!! Gigi mi mancherà...

Grazie a Simo... per l'aiuto che mi hai dato negli ultimi tre mesi. Grazie per essere stata una collega così attenta, precisa e scrupolosa... è stato bello lavorare con te... e farci salvare dai pompieri in quel di Porto Torres!!!

Grazie a Salva e col... perché sei sempre pronto ad aiutarmi. Grazie per il periodo trascorso insieme a Budejovice... non dimenticherò mai il ballo che mi hai concesso alla festa latina!!

Grazie a Jacopo, per tutti i consigli, le consulenze, le foto e i parassiti gentilmente concessimi!! Forse ti devo ancora un paio di birre... però il boccale ce l'hai!!

Grazie a Daria, per tutti gli insegnamenti sulla biologia molecolare, per tutte le consulenze e per la carineria con cui mi ha sempre messo a disposizione le sue competenze.

Grazie a Pablo Diaz, per quei piccoli ma tanto preziosi consigli che mi hanno aiutato nell'analisi molecolare dei campioni.

Grazie a Tiziana e Bastiano, per la piacevole collaborazione nello studio su *Anisakis*.

Grazie a Sarra, per i protocolli, i consigli e le consulenze su *Anisakis* e *Contracaecum*.

Grazie a Serena per aver testato parte dei campioni di "contracechi".

Grazie ai pescatori degli stagni dell'oristanese, in particolare la Cooperativa Pescatori e Molluschiatori di Cabras, che sempre con grande disponibilità ci hanno concesso i campioni di muggini.

Grazie a Paolo Briguglio e alla Merops srl, per averci messo a disposizione i campioni di *Contracaecum*.

Thanks to Tomas Scholz and Aneta Kostadinova, Institute of Parasitology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Ceské Budejovice, per tutti gli

insegnamenti sullo studio dei trematodi, e per aver messo a disposizione della mia ricerca la loro professionalità con molta pazienza e dedizione.

Grazie agli amici del mio primo lunch-club che a České Budejovice mi hanno fatto sentire a casa... Carlos, Gema, Raul, Isa, Simona, Jesus, Anirban.

Grazie a Paola e Davide, per essere stati Tutor attenti e precisi.

Grazie a tutto il personale ed ai colleghi di Parassitologia e Malattie Parassitarie: Paola, Antonio, Giuliana, Cesco, Cinzia, Narciso, Mariagiovanna, Pierpaolo, Claudia, Sabina, Prof. Scala, per i piacevoli momenti trascorsi in Istituto!!

Grazie a signor Franco... per il suo buonumore quotidiano.

Grazie anche ai colleghi di Ispezione degli Alimenti di Origine Animale, in particolare Francesca, Marta, Roberta, Francesca, Vincenzo, Daniele, Carlo, Christian...

Fra, Dani, Carlo, Chri... grazie per aver fortemente voluto insieme a me il lunch-club sassarese!!