

## PRESENZA DI LARVE DI ANISAKIDAE IN TRIGLIE DI FANGO (*MULLUS BARBATUS*) PESCATE NEL MAR LIGURE

Righetti M.<sup>1</sup>, Bona M.C.<sup>1</sup>, Sabbadini M.<sup>1</sup>, Scanzio T.<sup>1</sup>, Favaro L.<sup>1</sup>, Arsieni P.<sup>1</sup>, Serracca L.<sup>1</sup>, Ercolini C.<sup>1</sup>, Ru G.<sup>1</sup>, Fioravanti M.L.<sup>2</sup>, Prearo M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Via Bologna, 148 – 10154 Torino;

<sup>2</sup>Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Alma Mater Studiorum, Via Tolara di sopra, 50 – 40061 Ozzano Emilia (BO)

**Key words:** *Anisakis*, *Hysterothylacium*, *Mullus barbatus*

### SUMMARY

The nematodes parasites (*Anisakidae*) are usually assumed through consumption of contaminated seafood eaten uncooked. Marine mammals and marine birds are the final hosts of this parasite, while the intermediate hosts are planktonic or benthonic crustaceans. *Anisakis* spp. during its biological cycle affects many different commercial fish species. The aim was to evaluate the potential risk of seafood consumption from the Ligurian Sea. The parasitological survey was carried out from October 2010 to February 2013. 902 *Mullus barbatus* were analysed: 190 were collected in Imperia, 648 in Savona and 64 in La Spezia. The fish were weighed, measured and subjected to parasitological examination. The viscera were placed in a petri dish with physiological solution. The petri was positioned under a hot lamp to induce larvae migration outside the viscera. The parasites were fixed in 70% ethyl alcohol. The identification of the larval stages was conducted at the genus level by microscopic observation.

### INTRODUZIONE

La triglia di fango (*Mullus barbatus*), appartenente alla famiglia *Mullidae*, viene pescata in notevoli quantità per l'ottima qualità delle carni, generalmente con la pesca a strascico. Conseguentemente a questa tipologia di pesca, è possibile osservare su soggetti appena pescati, delle lesioni e/o desquamazioni che possono alterare facilmente la conservabilità del prodotto. Sono pesci carnivori, che si nutrono di crostacei e piccoli invertebrati bentonici, individuati sfruttando i due barbigli situati sotto il mento. È una specie comunemente presente nel Mediterraneo, di notevole interesse sui nostri mercati, tanto da essere commercializzata sia fresca che congelata (7).

Gli *Anisakidae* sono nematodi con corpo cilindrico, di lunghezza variabile da qualche millimetro ad alcuni centimetri. Il ciclo vitale di questi parassiti prevede un ospite intermedio costituito solitamente da un crostaceo planctonico eufasiaceo (componenti del krill) dove avviene la muta da L1 a L3 (stadio infettante); un secondo ospite, costituito da un pesce od un mollusco cefalopode che si infetta mangiando crostacei bentonici o planctonici all'interno dei quali è presente il terzo stadio larvale; l'ospite definitivo costituito da un mammifero marino, un uccello marino o un pesce teleosteo dove il parassita adulto raggiunge la maturità sessuale e produce le uova che verranno eliminate con le feci dall'ospite (6).

I crostacei eufasiacei sembrano essere i più importanti ospiti intermedi nel ciclo biologico del genere *Anisakis*; l'uomo si inserisce nel ciclo biologico di questo parassita come ospite accidentale e si infesta in seguito al consumo di pesci o cefalopodi (contenenti L3) assunti crudi o poco cotti. Le larve non completano il loro sviluppo nell'ospite accidentale, venendo inattivate in genere entro poche ore o pochi giorni, ma possono penetrare la mucosa gastrica o intestinale causando una serie di effetti patologici di diverso grado e natura.

Il ciclo biologico di *Hysterothylacium* è molto complesso e coinvolge da due a quattro ospiti consecutivi, alternandosi tra ospiti invertebrati e vertebrati nell'ambiente marino (4). Almeno un crostaceo è obbligatorio come ospite intermedio nella trasmissione di *Hysterothylacium*. Grandi invertebrati (chetognati o crostacei) possono fungere da secondi ospiti intermedi e varie specie di pesci si comportano da ospiti intermedi/paratenici o ospiti definitivi, acquisendo il parassita attraverso la catena alimentare (1; 5).

Resta da ricordare come *Anisakis* è agente di zoonosi nell'uomo (problematica di natura sanitaria), mentre *Hysterothylacium* non è considerato attualmente agente zoonosico, ma può conferire un aspetto ripugnante al prodotto ittico in caso di infestazione massiva (problematica di natura ispettivo-commerciale). Scopo del presente lavoro è la valutazione del grado di infestazione in popolazioni selvatiche di triglia di fango pescate nel Mar Ligure, andando a valutare la pressione delle due specie parassitarie prese in considerazione.

### MATERIALI E METODI

Il campionamento è stato condotto nel Mar Ligure dall'ottobre 2010 a febbraio 2013; sono state analizzate in totale 902 triglie di fango, suddivise in 190 esemplari pescati nella provincia di Imperia, 648 nella provincia di Savona e 64 nella provincia di La Spezia. Al momento del prelevamento sono state fornite e verificate le coordinate geografiche della zona di pesca.

Per il trasporto dei campioni dal luogo di prelevamento al Laboratorio di Ittiopatologia dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta sono stati utilizzati contenitori termici con panetti eutettici al fine di mantenere la catena del freddo.

Giunti in laboratorio ai diversi soggetti è stato assegnato un numero progressivo a cui far corrispondere le diverse misure biometriche (peso e lunghezza) e l'eventuale presenza/assenza di larve *Anisakidae*, rilevate dopo l'apertura della cavità celomatica. I soggetti sono stati pesati singolarmente mediante bilancia di precisione e misurati mediante carta millimetrata, misurando dall'apice della testa all'apice della coda e successivamente sottoposti ad esame parassitologico per la ricerca di larve di nematodi *Anisakidae* (procedura validata, POS 10DG145 00/00). Dopo un esame visivo della superficie esterna per individuare le eventuali larve fuoriuscite dall'ano o presenti sulla superficie corporea, si procedeva all'asportazione del pacchetto viscerale da ogni soggetto. Il pacchetto viscerale (delicata apertura degli organi che lo costituiscono per favorire la fuoriuscita delle larve eventualmente presenti) veniva posto in una capsula Petri con soluzione fisiologica; tutte le Petri sono state poi posizionate sotto una lampada da 100W per circa un'ora, per favorire la fuoriuscita delle larve eventualmente presenti. I parassiti riferibili a nematodi *Anisakidae* venivano successivamente isolati, contati e posti in microprovette tipo Eppendorf (contrassegnate con il relativo numero di

accettazione e di esemplare) contenenti una soluzione di alcool etilico 70°, al fine di ottenere un'ottimale conservazione dei parassiti. L'identificazione degli stadi larvali dei nematodi reperiti è stata condotta a livello di genere mediante osservazione microscopica (10 e 40 ingrandimenti), previa eventuale chiarificazione con lattofenolo di Amman e studio morfologico, seguendo gli schemi classificativi ancora oggi utilizzati (2; 9; 10). Le caratteristiche morfologiche considerate utili all'identificazione del genere parassitario di appartenenza sono state le dimensione del corpo, la conformazione del ventricolo, la presenza/assenza dell'appendice ventricolare, la presenza/assenza del cieco intestinale, la localizzazione del poro escretore e la presenza e morfologia del mucrone.

È stato inoltre calcolato il grado di infestazione per ogni lotto di campionamento, con prevalenza, intensità media ed abbondanza (3).

L'occorrenza delle due parassitosi è stata caratterizzata in termini di prevalenza calcolata separatamente per ciascuna e per i casi di coinfezione, come numero di casi per 100 capi sottoposti a esame parassitologico, a cui è stato associato il rispettivo intervallo di confidenza al 95% (IC 95%).

Uno studio di prevalenza trasversale (cross sectional) è stato utilizzato per testare il potenziale ruolo quale fattore di rischio di talune caratteristiche proprie della specie ittica presa in esame. Sono stati presi in considerazione due fattori di rischio: il peso e le dimensioni dei pesci, suddivisi in 2 classi. È stato utilizzato il valore della mediana per dividere in 2 categorie gli esemplari (esposti e non esposti).

L'associazione, in termini di *Odds Ratio* (OR), tra ciascuna parassitosi e i potenziali fattori di esposizione individuati, è stata valutata per mezzo di un'analisi univariata.

### RISULTATI E CONCLUSIONI

In questo studio sono stati isolati nematodi del genere *Anisakis* (sottofamiglia *Anisakinae*) e *Hysterothylacium* (sottofamiglia *Raphidascarinae*) (8).

Dalle misurazioni effettuate, si osserva che la lunghezza media è pari a 13,8 cm con un peso medio di 30 g; analizzando i risultati ottenuti si può osservare una positività per presenza di larve *Anisakidae* pari al 76,2% (688 esemplari su 902 campionati, suddivisi in 127 a Imperia, 530 a Savona e 31 a La Spezia). La positività riscontrata per presenza di larve di *Anisakis* è pari al 5,1% (46 esemplari) mentre è 53,5% per *Hysterothylacium* (483 pesci): sono stati inoltre individuati 159 soggetti con coinfezione (17,6%). Complessivamente sono state isolate 4.627 larve di *Anisakidae*, di cui l'11,8% identificate come *Anisakis* (544 larve) e l'88,2% come *Hysterothylacium* (4.083 larve).

L'intensità media riscontrata è pari a 6,73 mentre l'abbondanza è 0,60 per *Anisakis* e 4,53 per *Hysterothylacium*.

L'area con il maggior numero di esemplari infestati da larve di *Anisakidae* è stata quella della provincia di Savona, con una prevalenza del 81,79%, seguita da Imperia (66,84%) e La Spezia (48,44%, con prevalenza totale di *Hysterothylacium*). La prevalenza varia a seconda della provincia di pesca: a Imperia si ha una prevalenza di *Hysterothylacium* del 66,84% mentre 12 soggetti hanno presentato coinfezione (6,32%); a Savona si è ottenuta una prevalenza per *Anisakis* del 29,78% e del 74,69% per *Hysterothylacium*, con il 22,68% di coinfezioni.

L'intensità media di parassiti per esemplare rilevata ad Imperia è di 5,20 (con un massimo di 130 larve per esemplare), a Savona del 7,22 (con un massimo di 70 larve per pesce), mentre a La Spezia del 4,52 (con un massimo di 20). Per quanto riguarda l'abbondanza, sono stati calcolati i seguenti valori: a Imperia

0,09 per *Anisakis* e 3,38 per *Hysterothylacium*; a Savona 0,81 per *Anisakis* e 5,09 per *Hysterothylacium* mentre a La Spezia è stata rilevata solo *Hysterothylacium* con valori di abbondanza pari a 2,19.

L'analisi univariata per *Anisakis* ha mostrato che non vi sono significative differenze per quanto riguarda il rischio di parassitosi, né per l'effetto del peso, né per l'effetto delle dimensioni.

Pertanto, questo studio realizzato su un numero rappresentativo di esemplari, ha evidenziato una diffusa presenza di larve *Anisakidae* nella triglia di fango del Mar Ligure, anche con intensità medie di infestazione abbastanza elevate; la presenza di larve appartenenti al genere *Anisakis* varia molto dalle zone di pesca con un valore più elevato nella provincia di Savona rispetto a quella di Imperia, mentre non sono state rilevate positività nella provincia di La Spezia su questa specie ittica. Per quanto riguarda *Hysterothylacium* la sua prevalenza nel Mar Ligure è molto elevata in tutti gli areali considerati e rappresenta senza dubbio il nematode più frequente anche con intensità di infestazione elevatissime, tali da poter dare problemi di ordine ispettivo-commerciale. Comunque nelle triglie con maggior grado di infestazione (anche fino a 130 larve per individuo), non è mai stata osservata la presenza di larve visibili sulla superficie esterna.

### RINGRAZIAMENTI

Questa ricerca è stata finanziata con fondi di Ricerca Corrente del Ministero della Salute.

### BIBLIOGRAFIA

- Balbuena J.A., Karlsbakk E., Saksvik M., Kvenseth A.M., Nylund A. (1998). New data on the early development of *Hysterothylacium aduncum* (Nematoda, Anisakidae). *J. Parasitol.*, 84: 615–617.
- Berland B. (1961). Nematodes from some Norwegian marine fishes. *Sarsia*, 2: 1–50.
- Bush A.O., Lafferty K.H., Lotz J.M., Shostak A.W. (1997). Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited. *J. Parasitol.*, 83: 575–583.
- Klimpel S. (2005) Distribution of nematodes of the family *Anisakidae* in commercially important fish species from the central and northern North Sea. *Z. Fischk.*, 7 (2): 161–168.
- Køie M. (1993). Aspects of the life cycle and morphology of *Hysterothylacium aduncum* (Rudolphi, 1802) (Nematoda, Ascaridoidea, Anisakidae). *Can. J. Zool.*, 71: 1289–1296.
- Køie M., Berland B., Burt M.D.B. (1995). Development to third-stage larvae occurs in the eggs of *Anisakis simplex* and *Pseudoterranova decipiens* (Nematoda, Ascaridoidea, Anisakidae). *Can. J. Fisheries Aquat. Sci.*, 52: 134–139.
- Manzoni P., Tepedino V. (2008). Grande enciclopedia illustrata dei pesci. *Eurofishmarket*.
- Mattiucci S., Nascetti G. (2008). Advances and trends in the molecular systematics of *Anisakis* nematodes, with implications for their evolutionary ecology and host parasite co-evolutionary processes. *Advances in parasitology*, 66: chapter 2: 47-148.
- Möller H., Anders K. (1986). Nematelminthes. In *Diseases and parasites of marine fishes. Germany: Verlag Möller, Kiel*: 165-178.
- Moravec F. (1994). Parasitic Nematodes of freshwater fishes of Europe. *Kluwer Academic Publisher, Dordrecht (Netherlands)*.